

**Inhibitoren der humanen induzierbaren NO-Synthase aus Pilzen – Einfluss  
der kleinen G-Proteine der Rho-Familie auf die Expression der humanen  
induzierbaren NO-Synthase**

Dem Fachbereich Biologie  
Der Universität Kaiserslautern  
Zur Erlangung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

eingereichte  
DISSERTATION  
(D 386)

vorgelegt von  
**Michael Hausding**

Vorsitzender:	Prof. Dr. E. Neuhaus
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. T. Anke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Förstermann

Kaiserslautern, 10. Juli 2002

## **I. Inhaltsverzeichnis**

I.	<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	II
II.	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	X
III.	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	XIII
IV.	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	XIV
1	<b>Einleitung.....</b>	1
1.1	Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch verschiedene Isoformen der NO-Synthase.....	1
1.2	Isoformen der NO-Synthase.....	1
1.2.1	Konstitutive Formen der NO-Synthase.....	4
1.2.2	Die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS-2).....	5
1.3	Transkriptionelle Regulation der iNOS-Expression über unterschiedliche Signaltransduktionswege.....	8
1.3.1	Regulation der iNOS-Promotoraktivität (transkriptionelle Kontrolle).....	11
1.3.2	Regulation der Expression über die Änderung der iNOS-mRNA-Stabilität (post-transkriptionelle Kontrolle).....	12
1.4	Rolle der Cyclooxygenase-2 im Entzündungsgeschehen.....	13
1.5	Wirkstoffe als Regulatoren des entzündungsrelevanten Enzyms iNOS.....	15
1.6	Untersuchungen zur Funktion kleiner G-Proteine bei der Modulation der iNOS-Expression.....	17
1.6.1	Die kleinen G-Proteine.....	17
1.6.2	Ras und die kleinen G-Proteine der Rho-Familie.....	18
2	<b>Material.....</b>	22
2.1	Allgemeine Materialien.....	22
2.1.1	Laborgeräte.....	22
2.1.2	Chemikalien.....	23
2.1.2.1	Lösungsmittel für molekularbiologische Methoden in p.A.-Qualität.....	23
2.1.2.2	Spezielle Chemikalien.....	23
2.1.2.3	Radiochemikalien.....	24
2.1.3	Zelllinien zur Verwendung in Untersuchungen der Genexpression.....	25
2.1.4	Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur.....	26
2.1.4.1	Medien für Zellkultur.....	26
2.1.4.2	Cytokine für die Zellinduktion.....	27
2.1.5	Lösungen und Puffer für den allgemeinen Laborgebrauch.....	28
2.1.5.1	Lösungen und Puffer für DNA-Präparationen.....	28
2.1.5.2	Lösungen und Puffer für RNA-Präparationen.....	29
2.1.5.3	Puffer und Lösungen für die RNase-Verdauungsschutzanalyse.....	29
2.1.5.4	Puffer und Lösungen für die Griess-Analyse.....	31
2.1.5.5	Puffer und Lösungen für die Reporter-gen-Analyse.....	31
2.1.6	Plasmide.....	32

2.1.6.1	Plasmide zur Verwendung als Reporter-Gen-Vektoren (Transfektion humaner Zelllinien / Luciferase-Assay).....	32
2.1.6.2	Plasmide zur Verwendung als Matrizen für die <i>in vitro</i> -Transkription (RNase-Schutzanalyse) .....	33
2.1.6.3	Original-Plasmide zur Herstellung der DNA-Konstrukte.....	34
2.1.7	Enzyme.....	35
2.1.8	Kits.....	36
2.1.9	Sonstige Materialien.....	36
2.2	Spezielles Material für die „Isolierung von Wirkstoffen aus Pilzen mit Wirkung auf die Expression entzündungsrelevanter Enzyme“.....	36
2.2.1	Gerätschaft für die Durchführung von Pilzfermentationen und deren Analyse.	36
2.2.2	Chemikalien zur Analyse der Fermentationsprodukte.....	37
2.2.3	Oligonukleotide für die Gelretentionsanalyse.....	39
2.2.4	Kits zur Fermentationsverlaufsanalyse und für die Ermittlung der Zytotoxizität.....	39
2.2.5	Nährmedien für Pilze und Bakterien.....	39
2.2.6	Zusätzliche Zelllinien für die Analyse der Fermentationsprodukte.....	40
2.2.6.1	Promotor-Konstrukte vor Luciferase oder SEAP.....	42
2.2.6.2	Verwendung und Einstellung der Zellen für die Transfektion mit SEAP-Konstrukten.....	44
2.2.7	Bakterien.....	44
2.2.8	Bearbeitete Pilzstämmen.....	44
2.2.8.1	<i>Penicillium citrinum</i> (Stamm 48-93).....	44
2.2.8.2	<i>Penicillium spec</i> (Stamm 9-93).....	45
2.2.9	Testmikroorganismen für die biologische Charakterisierung.....	45
2.2.10	Medien für die transienten Transfektionsversuche mit pGL3NF- $\kappa$ B- und pTKGAS/ISRE-SEAP-Konstrukten in der HeLa-S3-Zelllinie .....	46
2.2.11	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden zur Evaluation der isolierten Wirkstoffe (Gelretentionsanalyse).....	46
2.2.12	Verbrauchsmaterial verwendet in „Suche nach Wirkstoffen“.....	47
2.3	Spezielles Material zum Teil „Beeinflussung der iNOS-Expression durch G-Proteine der Rho-Familie“.....	48
2.3.1	Chemikalien zur Analyse der Funktion der Rho-Proteine.....	48
2.3.2	Medien, Puffer und Lösungen für die Bakterienkultur.....	51
2.3.3	Zelllinien zur Analyse der Beeinflussung der iNOS durch kleine G- Proteine..	52
3	<b>Methoden</b> .....	54
3.1	Allgemeine Methoden.....	54
3.1.1	Wachstumsbedingungen, Vermehrung und Aufbewahrung von Zelllinien und Bakterienstämmen.....	54
3.1.1.1	Kultivierung und Aufbewahrung der Zelllinien.....	54
3.1.1.2	Aufbewahrung von Bakterienstämmen (kompetente Bakterien).....	55

3.1.2	Generelle Verwendung der Stamm-Zelllinien und der stabil transfizierten Zelllinien und Induktion von Zellen.....	55
3.1.3	Expressions-Analysen auf mRNA-Ebene.....	57
3.1.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen.....	57
3.1.3.2	Expression relevanter Enzyme für entzündliche Vorgänge im humanen System (RNase-Verdauungsschutzanalyse) .....	57
3.1.4	Luziferase-Reportergen-Analyse.....	60
3.1.4.1	iNOS-Promotor-Analyse.....	60
3.1.4.2	eNOS-Promotor-, COX-2-Promotor-Analyse und die Analyse von Transkriptionsfaktoren mittels Luziferase-Assay.....	61
3.1.4.3	Bradford-Proteinbestimmung.....	61
3.1.5	Klonierung zur Herstellung von Reportergen-Konstrukten und Matrizen für die <i>in vitro</i> -Transkription.....	62
3.1.5.1	Herstellung kompetenter E.coli-Zellen (DH5 $\alpha$ ).....	62
3.1.5.2	Transformation von Bakterien.....	62
3.1.5.3	Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	62
3.1.5.4	Maxi-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen Plasmid Maxi Kit).....	63
3.1.5.5	Restriktion von Plasmid-DNA (Kontroll-Schnitte).....	64
3.1.6	Analyse von Nukleinsäuren.....	64
3.1.6.1	Bestimmung der optischen Dichte von Nukleinsäurelösungen zur Messung der DNA/RNA-Konzentration.....	64
3.1.6.2	Elektrophorese zur Analyse von DNA.....	65
3.1.7	Griess-Analyse zur Ermittlung der iNOS-Aktivität.....	65
3.2	Spezielle Methoden zum Teil „Suche nach Inhibitoren der iNOS aus Pilzen“..	66
3.2.1	Wirkung der isolierten Substanzen auf Biosysteme (Zellen und Mikroorganismen).....	66
3.2.1.1	Untersuchungen zur Zytotoxizität der isolierten Verbindungen.....	66
3.2.1.1.1	MTS-Untersuchung zur Bestimmung der Proliferation von Zellen .....	66
3.2.1.1.2	Empirische Ermittlung der Zelldichte nach Behandlung.....	68
3.2.1.2	Agardiffusionstest (Bioautographie).....	68
3.2.2	Kultivierung der Pilze und Fermentationsanalysen.....	68
3.2.2.1	Fermentation von Pilzen.....	68
3.2.2.1.1	Fermentation in Schüttelkultur und Herstellung von Rohextrakten.....	69
3.2.2.1.2	Fermentation zur Aufreinigung der Sekundärstoffe aus Pilzen.....	69
3.2.2.2	Fermentationsanalysen.....	70
3.2.2.2.1	pH-Wert.....	70
3.2.2.2.2	Enzymatischer Nachweis des Glucose- und Maltosegehaltes der Kulturbrühe	70
3.2.2.2.3	Ermittlung des Myceltrockengewichtes.....	71
3.2.2.2.4	Abgasanalytik.....	71
3.2.2.2.5	Sekundärstoffnachweis mittels analytischer HPLC.....	71
3.2.3	Analyse des Einflusses der Wirkstoffe auf die DNA-, RNA- sowie der Proteinbiosynthese in A549/8-Zellen.....	71

3.2.4	Screening von Pilzrohextrakten, von teilaufgereinigten Extrakten und von Reinsubstanzen auf deren Einfluss auf entzündungsrelevante Enzyme.....	72
3.2.4.1	Screening nach Substanzen mit inhibitorischer Wirkung auf die sezernierbare alkalische Phosphatase (SEAP), deren Expression von Enhancer-Elementen (GAS/ISRE, NF- $\kappa$ B) abhängig ist.....	72
3.2.4.2	Screening nach Inhibitoren der Expression der humanen induzierbaren NO-Synthase (iNOS).....	73
3.2.4.3	Promotorstudien zur Hemmung der basalen Transkriptionsaktivität unter Verwendung von humanen ECVpGl <sub>3</sub> ecNOS(3.5)P1-Luc-Zellen.....	73
3.2.4.4	Studien zur Hemmung des 1.4kb-humanen COX-2-Promotors in humanen A549/8-Zellen und Einstellung der Induktionsbedingungen.....	74
3.2.5	Methoden zur Reinigung und physikalisch-chemischen Charakterisierung der Sekundärstoffe.....	75
3.2.5.1	Säulenchromatographie .....	75
3.2.5.2	Dünnschichtchromatographie .....	75
3.2.5.3	HPLC-Analyse.....	76
3.2.5.4	UV/Vis- und IR-Spektroskopie.....	77
3.2.5.5	Massenspektroskopie.....	77
3.2.5.6	NMR-Spektroskopie und Strukturaufklärung.....	77
3.2.6	Nachweis des Einflusses der isolierten Wirkstoffe auf die JAK2-STAT-1 $\alpha$ -Signaltransduktion durch die Gelretentionsanalyse.....	78
3.2.6.1	Isolierung von Kern-Protein zur Verifikation der Transkriptions-Faktor-Bindung an regulative Promotor-Konsensus-Sequenzen.....	78
3.2.6.2	Konzentrationsbestimmung für Kernproteine (Bichinchonic-Acid-Assay).....	78
3.2.6.3	Gelretentions-Analyse.....	79
3.3	Spezielle Methoden zur „Untersuchung des Einflusses der kleinen G-Proteine auf die iNOS-Expression“.....	80
3.3.1	Alkalische Hydrolyse von Lovastatin .....	80
3.3.2	Alkalische Hydrolyse von Mevalonat .....	80
4	<b>Ergebnisse</b> .....	81
4.1	Isolierung aktiver, auf die Expression der humanen iNOS hemmend wirkende Substanzen aus Pilzen und deren Strukturanalyse.....	81
4.1.1	Assay-Systeme zur Suche nach transkriptionellen Inhibitoren der iNOS.....	81
4.1.2	Suche nach Inhibitoren entzündungsrelevanter Enzyme über Assay-Systeme..	82
4.1.3	Isolierung von transkriptionellen Inhibitoren des entzündungsrelevanten Enzyms iNOS.....	83
4.1.3.1	Sporogen-A01 aus <i>Penicillium citrinum</i> (Stamm 48-93).....	83
4.1.3.1.1	<i>Penicillium citrinum</i> (48-93).....	83
4.1.3.1.2	Fermentation von 48-93.....	83
4.1.3.1.3	Isolierung von Sporogen-A01 aus 48-93.....	85
4.1.3.1.4	Physikalisch-chemische Charakterisierung und Strukturaufklärung von Sporogen-A01.....	85

4.1.3.2	S-Curvularin aus dem Stamm <i>Penicillium</i> spec 9-93.....	88
4.1.3.2.1	Produzentenstamm 9-93.....	88
4.1.3.2.2	Fermentation von 9-93.....	88
4.1.3.2.3	Isolierung von S-Curvularin aus Stamm 9-93.....	89
4.1.3.2.4	Physikalisch-chemische Charakterisierung und Strukturaufklärung von S-Curvularin.....	89
4.1.3.3	Die STAT-1 $\alpha$ Signaltransduktionswege in humanen HeLa-S3-Zellen hemmende Verbindung S14-95.....	90
4.1.4	Biologische Aktivität der isolierten Substanzen.....	91
4.1.4.1	Wirkung der Substanzen auf das Wachstum humaner Zelllinien in der MTS-Proliferations-Analyse.....	91
4.1.4.1.1	Sporogen-A01.....	91
4.1.4.1.2	S-Curvularin.....	92
4.1.4.1.3	S14-95.....	93
4.1.4.2	Effekte der isolierten Wirkstoffe auf die Funktion entzündungsrelevanter Transkriptionsfaktoren in Reporter-gen-Analysen mit stabilen humanen Zelllinien.....	94
4.1.4.2.1	Sporogen-A01.....	94
4.1.4.2.1.1	Wirkung von Sporogen-A01 auf die JAK-STAT-Signaltransduktion in stabilen A549/8pGASLuc-Zellen.....	94
4.1.4.2.1.2	Wirkung von Sporogen-A01 auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte Signaltransduktion....	95
4.1.4.2.1.3	Wirkung von Sporogen-A01 auf die COX-2-Promotoraktivität.....	96
4.1.4.2.2	S-Curvularin.....	97
4.1.4.2.2.1	Wirkung von S-Curvularin auf die JAK-STAT-Transduktionskaskade.....	97
4.1.4.2.2.2	Wirkung von S-Curvularin auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte Signaltransduktion.....	98
4.1.4.2.2.3	Wirkung von S-Curvularin auf die COX-2-Promotoraktivität.....	98
4.1.4.2.2.4	Wirkung von S-Curvularin auf die TNF- $\alpha$ -Promotoraktivität.....	99
4.1.4.2.3	S14-95.....	99
4.1.4.2.3.1	Wirkung von S14-95 auf die JAK2-STAT-1 $\alpha$ -Signaltransduktions-Kaskade..	99
4.1.4.2.3.2	Wirkung von S14-95 auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte Signaltransduktion.....	100
4.1.4.2.3.3	Wirkung von S14-95 auf die COX-2-Promotoraktivität.....	101
4.1.4.2.3.4	Wirkung von S14-95 auf die TNF- $\alpha$ -Promotoraktivität.....	102
4.1.4.2.3.5	Wirkung von S14-95 auf die NFAT-Signaltransduktion.....	102
4.1.4.3	Wirkung der isolierten Substanzen aus Pilzen auf die Makromolekülbio-synthesen (DNA-, RNA- und Proteinsynthese) in humanen Zelllinien.....	103
4.1.4.4	Effekte der Wirkstoffe auf die Funktion von entzündungs-relevanten Promotoren in Reporter-gen-Analysen in humanen Zelllinien.....	104
4.1.4.4.1	Sporogen-A01.....	104
4.1.4.4.1.1	Wirkung von Sporogen-A01 auf die iNOS-Promotor-Aktivität.....	104
4.1.4.4.1.2	Wirkung von Sporogen-A0 1 auf die eNOS-Promotor-Aktivität.....	105
4.1.4.4.2	S14-95.....	105
4.1.4.4.2.1	Wirkung von S14-95 auf die iNOS-Promotor-Aktivität.....	105
4.1.4.4.2.2	Wirkung von S14-95 auf die eNOS-Promotor-Aktivität.....	106
4.1.4.4.3	S-Curvularin.....	107

4.1.4.4.3.1	Wirkung von S-Curvularin auf die iNOS-Promotor-Aktivität.....	107
4.1.4.4.3.2	Wirkung von S-Curvularin auf die eNOS-Promotor-Aktivität.....	107
4.1.4.5	Effekte der Wirkstoffe auf die mRNA-Expression der induzierbaren NO-Synthase in humanen Zelllinien.....	108
4.1.4.5.1	Konzentrationsabhängige Hemmung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression durch Sporogen-A01.....	108
4.1.4.5.2	Konzentrationsabhängige Inhibition der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA Expression durch S-Curvularin.....	109
4.1.4.5.3	Konzentrationsunabhängige Hemmung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA Expression durch S14-95 im Bereich hoher S14-95-Konzentrationen (0,23 mM) .....	110
4.1.4.6	Hemmung der NO-Produktion durch isolierte Wirkstoffe als Indikator für die iNOS-Expression in A549/8-Zellen.....	111
4.1.4.6.1	Sporogen-A01.....	111
4.1.4.6.2	S-Curvularin.....	112
4.1.4.6.3	S14-95.....	113
4.1.4.7	Abhängigkeit der iNOS-Expression von der STAT-1 $\alpha$ -Aktivierung in A549/8-Zellen - Inhibition durch Sporogen-A01.....	113
4.2	Effekte der kleinen G-Proteine der Rho-Familie auf die Expression der induzierbaren NO-Synthase in murinen und humanen Zelllinien.....	115
4.2.1	Verstärkung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression in DLD1-, A549/8- und Balb 3T3-Zellen durch direkte und indirekte Rho-Inhibitoren..	115
4.2.1.1	Verstärkender Einfluss der Statine auf die humane sowie die murine iNOS-mRNA-Expression.....	115
4.2.1.1.1	Statine verstärken die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen.....	116
4.2.1.1.2	Statine verstärken die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in DLD1-Zellen.....	117
4.2.1.1.3	Statine verstärken die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in murinen Balb 3T3-Zellen.....	119
4.2.1.2	Einfluss von Lovastatin und Atorvastatin auf die Nitrit-Produktion als Maß für die iNOS-Aktivität in humanen Zellen.....	120
4.2.1.3	Erhöhung der Cytokin-induzierten iNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten DLD1-, jedoch nicht in transfizierten A549/8-Zellen durch Statine.	122
4.2.2	Wiederaufhebbarkeit der Statin-vermittelten Superinduktion der iNOS-mRNA-Expression durch Mevalonat in DLD1-Zellen.....	127
4.2.3	Wiederaufhebbarkeit der Lovastatin-bedingten Superinduktion der Cytokin-induzierten iNOS-Promotoraktivität in DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen durch Mevalonat.....	129
4.2.4	Wirkung von FPP und GGPP auf die Statin-induzierte iNOS-Superinduktion.....	130
4.2.5	Verstärkender Einfluss des Toxin B aus <i>Clostridium difficile</i> (TcdB) auf die iNOS-mRNA-Expression in murinen und humanen Zelllinien.....	133
4.2.5.1	TcdB superinduziert die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in humanen Zelllinien.....	133

4.2.5.2	TcdB superinduziert geringfügig die Cytokin-induzierte iNOS-Promotor-Aktivität in humanen Zelllinien.....	134
4.2.5.3	Verstärkender Einfluss von Toxin B auf TNF- $\alpha$ -induzierte iNOS-mRNA-Expression in murinen Balb 3T3-Zellen.....	135
5	<b>Diskussion</b> .....	137
5.1	Suche, Auffindung und Analyse dreier die iNOS-Expression via dem JAK-STAT-Weg hemmender Wirkstoffe.....	137
5.1.1	Reporter-Analyse-Systeme und die verwendeten Vektoren für das Screening von Fermentationsprodukten mit Entzündungsrelevanz.....	137
5.1.1.1	Etablierung und Bewertung von Reporter-Screening-Analyse-Systemen zur Suche nach spezifischen, die iNOS-Expression über den JAK-STAT-Weg inhibierenden Substanzen aus Pilzen.....	137
5.1.1.2	Reportergen-Systeme zur Analyse von Fermentationsprodukten.....	139
5.1.2	Reportergen-Systeme zur Analyse von Fermentationsprodukten.....	140
5.1.2.1	Sporogen-A01 als Hemmstoff der IFN- $\gamma$ -abhängigen Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression und Nitrit-Produktion aus <i>Penicillium citrinum</i> (48-93).....	141
5.1.2.1.1	Sporogen-A01 hemmt die Aktivität des Cytokin-induzierten humanen iNOS-Promotors in A549/8 pNOS2(16)Luc-Zellen und die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen.....	143
5.1.2.1.2	Sporogen-A01 hemmt die Cytokin-induzierte Nitrit-Produktion in humanen A549/8-Zellen über die Hemmung IFN- $\gamma$ -abhängiger Signaltransduktionswege.....	143
5.1.2.2	S-Curvularin als Inhibitor der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression und Nitrit-Produktion aus <i>Penicillium spec</i> (9-93).....	144
5.1.2.2.1	S-Curvularin hemmt die Aktivität des Cytokin-induzierten humanen iNOS-Promotors in A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen und die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen.....	145
5.2.2.2.2	S-Curvularin hemmt die Cytokin-induzierte Nitrit-Produktion von humanen A549/8-Zellen konzentrationsabhängig und beeinflusst divergierende Wege zur Aktivierung der iNOS.....	145
5.1.2.3	S14-95 als Inhibitor der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression und Nitrit-Produktion aus <i>Penicillium spec</i> (Stamm 14-95).....	146
5.1.2.3.1	S14-95 hemmt die Aktivität des Cytokin-induzierten humanen iNOS-Promotors in A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen und die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen.....	147
5.1.2.3.2	S14-95 hemmt die Cytokin-induzierte Nitrit-Produktion in humanen A549/8-Zellen konzentrationsabhängig und beeinflusst STAT-1 $\alpha$ , nicht aber NF- $\kappa$ B- abhängige Wege zur Aktivierung der iNOS.....	147
5.1.2.4	Wirkungen der isolierten Verbindungen auf die (transkriptionelle) Regulation der humanen iNOS.....	148
5.2	Regulation der iNOS-Expression über kleine G-Proteine der Rho-Familie....	149
5.2.1	Verstärkung der Cytokin-induzierten iNOS-Expression.....	149



5.2.1.1	Molekulare Mechanismen der Beeinflussung der iNOS-Expression über die Transkriptionsrate in humanen und murinen Zelllinien durch Statine.....	150
5.2.2	Aufhebung der Statin-vermittelten Superinduktion der iNOS-Expression durch Mevalonat und Geranylgeranylpyrophosphat, bei nur geringer Reduktion durch Farnesylpyrophosphat in humanen Zelllinien.....	153
5.2.3	Steigerung der Cytokin-induzierten iNOS-Expression durch <i>Clostridium difficile</i> Toxin B-vermittelte direkte Rho-Hemmung in humanen und murinen Zelllinien.....	156
6	<b>Zusammenfassung</b> .....	160
6.1	Zusammenfassung „Isolierung von transkriptionell wirksamen Inhibitoren der humanen iNOS aus Pilzen“.....	160
6.2	Zusammenfassung „Negative Regulation der iNOS-mRNA-Synthese durch kleine G-Proteine der Rho-Familie“.....	161
7	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	162
	<b>Lebenslauf</b> .....	182
	<b>Danksagung</b> .....	183
	<b>Publikationen</b> .....	184

## II. Abbildungsverzeichnis

1-1	Schematische Darstellung von Struktur und Funktion der NO-Synthasen.....	3
1-2	Aktivierung der humanen iNOS-Promotors.....	10
1-3	Zusammenhänge zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel in Pilzen.....	16
1-4	Der Mevalonat-Weg.....	21
2-1	Struktur der in humane Zelllinien transfizierten Promotoren, von denen die Luziferase-Expression abhängig ist.....	42
2-2	Struktur der in humane Zelllinien transfizierten Enhancer-Element-Konsensus- Sequenzen vor Minimalpromotoren, von denen die SEAP- bzw. die Luziferase- Expression abhängig ist.....	43
3-1	Reaktion von MTS zum Formazan-Produkt durch die PES-vermittelte Elektronenübertragung.....	67
3-2	Optimierung der Induktionsbedingungen und -zeiten für A549/8-Zellen transient co-transfiziert mit pG <sub>l</sub> hCOX(1.4)Luc und pRenilla.....	74
4-1	Fermentationsverlauf von 48-93.....	84
4-2	Aufreinigungsschema für Sporogen-A01 .....	85
4-3	LC-MS-Spektren von Sporogen-A01.....	86
4-4	IR-Spektrum von Sporogen-A01.....	87
4-5	Struktur von Sporogen-A01.....	88
4-6	Aufreinigungsschema von S-Curvularin.....	89
4-7	Struktur von S-Curvularin.....	90
4-8	Struktur von S14-95.....	91
4-9	Einfluss des Sporogen-A01 auf die A549/8-Zellen-Proliferation .....	92
4-10	Einfluss des S-Curvularin auf die A549/8-Zellen-Proliferation .....	92
4-11	Einfluss des S14-95 auf die A549/8-Zellen-Proliferation .....	93
4-12	Einfluss des Sporogen-A01 auf die GAS-vermittelte Promotoraktivität in stabil transfizierten A549/8pGASLuc-Zellen.....	94
4-13	Einfluss des Sporogen-A01 auf die GAS/ISRE-vermittelte Promotoraktivität in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen.....	95
4-14	Einfluss des Sporogen-A01 auf die NF-κB-vermittelte Promotoraktivität in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen.....	96
4-15	Einfluss des Sporogen-A01 auf die TPA-induzierte COX-2-Promotoraktivität in transient transfizierten A549/8-Zellen.....	97
4-16	Einfluss des S-Curvularin auf die GAS-vermittelte Promotoraktivität in stabil transfizierten A549/8pGASLuc-Zellen.....	98
4-17	Einfluss des S-Curvularin auf die TPA-induzierte COX-2-Promotoraktivität in transient transfizierten A549/8-Zellen.....	99
4-18	Einfluss des S14-95 auf die GAS-vermittelte Promotoraktivität in stabil transfizierten A549/8pGASLuc-Zellen.....	100

4-19	Einfluss des S14-95 auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte SEAP-Aktivität in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen.....	101
4-20	Einfluss des S14-95 auf die TPA-induzierte COX-2-Promotoraktivität in transient transfizierten A549/8-Zellen.....	102
4-21	Wirkung von Sporogen-A01 auf die Biomolekül-Synthese.....	103
4-22	Wirkung von Sporogen-A01 auf die iNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen.....	104
4-23	Wirkung von Sporogen-A01 auf die eNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten ECVpecNOS(3.5)P1Luc-Zellen.....	105
4-24	Wirkung von S14-95 auf die iNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen.....	106
4-25	Wirkung von S14-95 auf die eNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten ECVpecNOS(3.5)P1Luc-Zellen.....	106
4-26	Wirkung von S-Curvularin auf die iNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen.....	107
4-27	Wirkung von S-Curvularin auf die eNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten ECVpecNOS(3.5)P1Luc-Zellen.....	108
4-28	Hemmender Einfluss von Sporogen-A01 auf die iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen.....	109
4-29	Hemmender Einfluss von S-Curvularin auf die iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen.....	110
4-30	Hemmender Einfluss von S14-95 auf die iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen.....	111
4-31	Hemmender Einfluss von Sporogen-A01 auf die Cytokin-induzierte NO-Produktion.....	112
4-32	Inhibitorischer Einfluss von S-Curvularin auf die Cytokin-induzierte NO-Produktion.....	112
4-33	Hemmender Einfluss von S14-95 auf die Cytokin-induzierte NO-Produktion.....	113
4-34	Inhibitorische Wirkung von Sporogen-A01 auf die Bindung von STAT-1 $\alpha$ an GAS-Konsensus-Bindestellen im Zellkern.....	114
4-35	Einfluss der Statine auf die mRNA-Expression der induzierbaren NO-Synthase in Cytokin-induzierten A549/8-Zellen .....	117
4-36	Einfluss der Statine auf die mRNA-Expression der induzierbaren NO-Synthase in Cytokin-induzierten DLD1-Zellen.....	118
4-37	Einfluss der Statine auf die mRNA-Expression der induzierbaren NO-Synthase in TNF- $\alpha$ -induzierten Balb 3T3-Zellen.....	119/120
4-38	Steigerung der Cytokin-induzierten NO-Produktion in DLD1- und in A549/8-Zellen durch Atorvastatin und Lovastatin.....	121
4-39	Einfluss von Lovastatin und Atorvastatin auf den Promotor der induzierbaren NO-Synthase (16kb) in Cytokin-induzierten A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen.....	124
4-40	Superinduktion des Promotors der induzierbaren NO-Synthase (16kb) in Cytokin-induzierten DLD1-Zellen durch Lovastatin und Atorvastatin.....	125

4-41	Erhöhung der Cytokin-induzierten iNOS-Promotoraktivität in DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen durch Atorvastatin und Lovastatin.....	126
4-42	Wiederaufhebbarkeit der Statin-vermittelten Superinduktion der iNOS-mRNA-Expression durch Mevalonat in DLD1-Zellen.....	128
4-43	Aufhebende Wirkung von Mevalonat auf die Lovastatin-superinduzierte Aktivität des iNOS-Promotors in Cytokin-induzierten DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen.....	129
4-44	Wiederaufhebbarkeit der Statin-Wirkung auf die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression durch GGPP bei nur geringer Reduktion durch FPP in DLD1-Zellen.....	130
4-45	Aufhebende Wirkung von GGPP auf die Lovastatin-superinduzierte Aktivität des iNOS-Promotors in Cytokin-induzierten DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen .....	131
4-46	Kein wesentlicher Einfluss von GGPP oder FPP auf die iNOS-Promotoraktivität in DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen in Abwesenheit von Statinen.....	132
4-47	Steigerung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression nach Behandlung von A549/8-Zellen mit TcdB.....	133
4-48	Steigerung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression nach Behandlung von DLD1-Zellen mit TcdB.....	134
4-49	Keine Induktion der iNOS-Promotoraktivität durch TcdB in stabil transfizierten A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen und geringfügige Erhöhung der iNOS-Promotoraktivität durch das Toxin in DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen.....	135
4-50	Steigerung der TNF- $\alpha$ -induzierten iNOS-mRNA-Expression nach Behandlung von Balb3T3-Zellen mit Toxin B.....	136
5-1	Vermutliche Wirkweise der aus Pilzen isolierten Substanzen S14-95, Sporogen-A01 und S-Curvularin.....	148
5-2	Einfluss von Atorvastatin und Lovastatin auf die Biosynthese von Mevalonat, Farnesyl- und Geranylgeranylpyrophosphat, Wirkung von Toxin B.....	159

### III. Tabellenverzeichnis

1-1	Charakterisierung der humanen NOS-Isoformen.....	3
2-1	Allgemein verwendete Zelllinien.....	25
2-2	Medienzusätze für die allgemein verwendeten Zelllinien.....	26
2-3	Cytokine zur Induktion der iNOS und ihre Herkunft.....	27
2-4	Zum Zwecke der Induktion von iNOS verwendete Cytokin-Konzentrationen.....	28
2-5	Plasmid-DNA für die Transfektion humaner Zelllinien.....	32
2-6	Plasmid-DNA-Spezies für die RNA-Sonden-Herstellung	33
2-7	Ursprüngliche Plasmid-DNA-Spezies für die Herstellung der Konstrukte	34
2-8	Verwendete Enzyme für die RNase-Verdauungsschutzanalyse, Zellkultur für die SEAP-Reporter-Gen-Analyse und Restriktionsanalysen.....	35
2-9	Zusammensetzung der Medien für die Kultivierung der Pilze und Bakterien auf Festagar, in Schüttelkolben oder in Fermenter-Kultur.....	40
2-10	Zelllinien und ihre Herkunft aus humanem Gewebe oder durch stabile Transfektion mit einem Reporter-Plasmid veränderte Zelllinien.....	41
2-11	Eigenschaften der für die Analyse der für Reporter-Gen- und RNA Expressions-Analysen in Bezug auf den Wirkstoff-Einfluss auf die iNOS-Expression verwendete „normale“ und stabil transfizierte Zelllinien und deren Kulturmedien.....	41/42
2-12	Die für den Agardiffusionstest eingesetzten Mikroorganismen zur Charakterisierung der antifungischen oder –biotischen Aktivität getesteter Verbindungen.....	45
2-13	Bei transienter Transfektion von humanen HeLa-S3-Zellen (nach der Elektroporations-Methode) verwendete Medien.....	46
2-14	Beschreibung der speziellen Chemikalien zur Untersuchung der Funktion der Rho-GTPasen der Rho-Familie in Bezug auf die Regulation der iNOS.....	48/49
2-15	Charakterisierung und Einsatz der speziellen Chemikalien zur Untersuchung der Funktion der Rho-GTPasen der Rho-Familie in Bezug auf die Regulation der iNOS.....	50
2-16	Zelllinien und ihre Herkunft aus humanen Gewebe und durch stabile Transfektion mit einem Reporter-Plasmid transfizierte Zelllinien.....	52
2-17	Für die Analyse der verwendeten Zelllinien und stabil transfizierte Zelllinie für Reporter-Gen- und RNA-Expressions-Analysen in Bezug auf die iNOS-Expression reguliert von kleinen G-Proteinen.....	53
3-1	Bedingungen für die Cytokin-abhängige Zellinduktion in humanen Zelllinien.....	56
3-2	In der RNase-Verdauungsschutz-Analyse verwendete cDNA-Matrizen für die <i>in vitro</i> -Transkription.....	58
3-3	Lösungsmittel-Gradient zur Elution von Fermenter-Rohextrakten.....	75
3-4	HPLC-Gradient zur qualitativen sowie zur quantitativen Analyse der Roh-Extrakte .....	76
4-1	Relative Häufigkeit der Peaks in den Massenspektren von den Sporogen-A01.....	87
5-1	Selektionskriterien für inhibitorische, die iNOS-Synthese und den COX-2-Promotor hemmende Extrakte und Reinsubstanzen.....	138
5-2	Analysesysteme zur Bewertung aufgereinigter Fermentationsprodukte.....	141

## VI. Abkürzungsverzeichnis

<u>A</u>	<u>A</u> denin
<u>ADP</u>	<u>A</u> denosin <u>d</u> iphosphat
<u>APS</u>	<u>A</u> mmoniumperoxodisulfat
<u>ATP</u>	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
<u>BAL</u>	<u>B</u> roncho- <u>a</u> lveoläre <u>L</u> avage
<u>BH<sub>4</sub></u>	5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
<u>bp</u>	<u>B</u> asenpaare
<u>BSA</u>	Rinderserumalbumin ( <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
<u>cDNA</u>	(zur mRNA) <u>c</u> omplementäre DNA
<u>cGMP</u>	cyklisches <u>G</u> uanosin <u>m</u> onophosphat
<u>C</u>	<u>C</u> ytosin
<u>CAG</u>	1:1:1-Mischung aus <u>C</u> TP, <u>A</u> TP und <u>G</u> TP
<u>CaM</u>	<u>C</u> al <u>m</u> odulin
<u>CK</u>	<u>C</u> reatin- <u>K</u> inase
<u>CM</u>	Cytokin-Gemisch (cytokine <u>m</u> ixture)
<u>CRE</u>	<u>c</u> AMP- <u>r</u> esponsives <u>E</u> lement
<u>CREB</u>	<u>c</u> AMP <u>R</u> esponse <u>E</u> lement- <u>B</u> inding Protein
<u>DEPC</u>	<u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonat
<u>DLD1</u>	humane Kolon-Adenokarzinom-Zellen
<u>DMEM</u>	<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium)
<u>DMSO</u>	<u>D</u> imethylsulfo <u>x</u> id
<u>DNase</u>	<u>D</u> esoxyribonukle <u>a</u> se
<u>DNA</u>	Desoxyribonukleinsäure ( <u>d</u> eoxyribon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
<u>ds</u>	<u>d</u> oppelsträngig
<u>DTT</u>	1,4- <u>D</u> ithiothreitol
<u>EDTA</u>	<u>E</u> thylendiamintetraessigsäure
<u>ELISA</u>	enzyme <u>l</u> inked immunosorbent <u>a</u> ssay
<u>eNOS</u>	endotheliale Isoform der NOS (NOS III)
<u>FAD</u>	<u>F</u> lavin- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotid
<u>FAPP</u>	<u>F</u> ormamid- <u>P</u> robenpuffer

<u>FCS</u>	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
<u>FGF</u>	fibroblast growth factor
<u>FMN</u>	Flavin-Mononukleotid
<u>G</u>	Guanin
<u>GAPDH</u>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<u>GDP</u>	Guanosindiphosphat
<u>GIT</u>	Guanidiniumisothiocyanat-haltiger Puffer
<u>GTP</u>	Guanosintriphosphat
<u>IFN-<math>\gamma</math></u>	Interferon $\gamma$
<u>I-<math>\kappa</math>B</u>	Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B
<u>IL-1<math>\beta</math></u>	Interleukin 1 $\beta$
<u>iNOS</u>	induzierbare Isoform der NOS (NOS II)
<u>IRF</u>	Interferon-regulierter Faktor
<u>JAK</u>	Janus-Kinase
<u>kb</u>	Kilo-Basen
<u>kDa</u>	Kilo-Dalton
<u>Ko</u>	Unbehandelte Kontrollzellen
<u>LPS</u>	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
<u>MAP</u>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<u>MAPK</u>	MAP-Kinase
<u>mRNA</u>	messenger-RNA, Boten-RNA
<u>MW</u>	Molekulargewicht
<u>NADH</u>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
<u>NADPH</u>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
<u>NEDA</u>	Naphthylethylendiamin
<u>NF-<math>\kappa</math>B</u>	Nukleärer Faktor- $\kappa$ B
<u>nNOS</u>	neuronale Isoform der NOS (NOS I)
<u>NO</u>	Stickstoffmonoxid
<u>NOS</u>	Stickstoffmonoxid-Synthase
<u>NOS I</u>	neuronale Isoform der NOS (nNOS)
<u>NOS II</u>	induzierbare Isoform der NOS (iNOS)
<u>NOS III</u>	endotheliale Isoform der NOS (eNOS)

<u>nt</u>	<u>N</u> ukleotide
<u>O. D.</u>	Extinktion ( <u>o</u> ptical <u>d</u> ensity)
<u>PBS</u>	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
<u>PEI</u>	Phosphatidylethylenimin
<u>PIPES</u>	Piperazin-1,4-bis(2- <u>e</u> thansulfonsäure)-haltiger Puffer
<u>PKA</u>	<u>P</u> roteink <u>i</u> nase <u>A</u>
<u>PKC</u>	<u>P</u> roteink <u>i</u> nase <u>C</u>
<u>PNK</u>	<u>P</u> olynukleotid- <u>K</u> inase
<u>PNS</u>	<u>P</u> eripheres <u>N</u> ervensystem
<u>RNase</u>	<u>R</u> ibonuklease
<u>RNA</u>	Ribonukleinsäure ( <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid)
<u>RT</u>	<u>R</u> aumtemperatur
<u>SA</u>	<u>S</u> ulfanilamid
<u>SDS</u>	Natriumdodecylsulfat ( <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
<u>sGC</u>	Lösliche Guanylatzyklase ( <u>s</u> oluble <u>G</u> uanylate <u>C</u> yclase)
<u>STAT</u>	Signal-Transduktor und Aktivator der Transkription ( <u>s</u> ignal <u>t</u> ransducer and <u>a</u> ctivator of <u>t</u> ranscription)
<u>T</u>	<u>T</u> hymine
<u>TAE</u>	<u>T</u> ris-HCl-, <u>E</u> ssigsäure- und <u>E</u> DTA-haltiger Puffer
<u>TBE</u>	<u>T</u> ris-HCl-, <u>B</u> orsäure- und <u>E</u> DTA-haltiger Puffer
<u>TEMED</u>	N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
<u>TGF-β</u>	Transformierender Wachstumsfaktor β ( <u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor β)
<u>TNF-α</u>	<u>T</u> umornekrosefaktor α
<u>TPA</u>	<u>T</u> etradecanoyl- <u>P</u> horbol-13- <u>A</u> acetat, entspricht <u>P</u> horbol-12- <u>M</u> yristat-13- <u>A</u> acetat (PMA)
<u>tRNA</u>	<u>t</u> ransfer-RNA
<u>U</u>	<u>U</u> racil
<u>UDP</u>	<u>U</u> ridindiphosphat
<u>UTP</u>	<u>U</u> ridintriphosphat
<u>UTR</u>	<u>u</u> ntranslatierte <u>R</u> egion eines Gens
<u>VEGF</u>	<u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
<u>ZNS</u>	<u>Z</u> entrales <u>N</u> ervensystem



## **1 Einleitung**

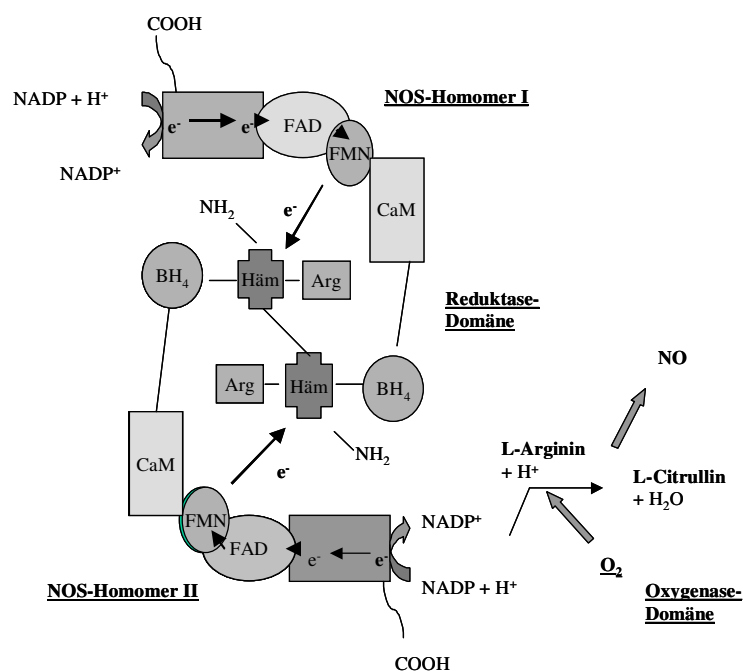
### **1.1 Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch verschiedene Isoformen der NO-Synthase**

Das Enzym NO-Synthase (NOS) ist ein in vielen Zellen vorkommendes Enzym (HAUSLADEN *et al.*, 1998) und sein Effektormolekül Stickstoffmonoxid (NO) ist für die Aufrechterhaltung entzündlicher Vorgänge ein wichtiger Modulator. Zunächst nur als Bestandteil von Abgasen bekannt, nimmt NO und die Modulation der Aktivität der vor allem bei akuten Entzündungsvorgängen aktiven iNOS (induzierbare NO-Synthase) eine bedeutende Rolle bei entzündlichen Vorgängen ein. NO als kleinstes bioaktives, nur zweiatomiges Molekül über gute Diffusionseigenschaften und hat aufgrund der geringen Halbwertszeit räumlich sowie zeitlich nur eine begrenzte Wirkung (FÖRSTERMANN & KLEINERT, 1995) NO reagiert als Radikal in wässrigem Milieu schnell mit Superoxid zum zytotoxischem Peroxynitrit (GELLER & BILLIAR, 1998). Das Target von NO ist die lösliche Guanylatzyklase (sGC), deren Aktivierung zu einem Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels und zur Muskelrelaxation führt. Auch Hemmstoffe der Phosphodiesterasen bewirken einen starken Anstieg der zyklischen Nukleotide und nachfolgend kommt es durch vermehrte Translokation des cytosolischen  $\text{Ca}^{+}$  in Speichervesikel zur Erschlaffung der Muskulatur (MURAD, 1998). Neben den gewünschten NO-Wirkungen wie der Blutdruckregulation, der Thrombozyten-Aggregationshemmung und der Unterstützung der Wundheilung kann das in pathophysiologischen Situationen gebildete NO auch auf körpereigenes Gewebe zytotoxische Einflüsse haben und Entzündungssymptome vermitteln. Die therapeutische Nutzung des NO in seiner großen Bandbreite und die Unterdrückung seiner unerwünschten zytotoxischen Effekte setzt die Aufklärung der zellspezifischen NOS-Regulation des menschlichen Organismus voraus.

### **1.2 Isoformen der NO-Synthase**

NO wird durch das im Säugetier- und damit auch im menschlichen Organismus in drei bekannten Isoformen vorkommende Enzym NO-Synthase (NOS; EC 1.14.13.39) gebildet (FÖRSTERMANN & KLEINERT, 1995; GELLER & BILLIAR, 1998). Die konstitutiv exprimierten NOS-Formen nNOS (neuronal NOS) und eNOS (endotheliale NOS) wurden

Anfang der neunziger Jahren erstmals beschrieben (BREDT & SNYDER, 1990; SCHMIDT *et al.*, 1991; FÖRSTERMANN *et al.*, 1991). Die induzierbare iNOS konnte bereits 1985 von Stuehr & Marletta aus LPS-stimulierten murinen Makrophagen isoliert werden. Der Aufbau der NO-Synthasen ist Isoform-unabhängig und der Mechanismus der Reduktion von L-Arginin unter Bildung von NO und Citrullin am zentralen Häm gleich. Ein zentrales im Häm gebundenes Eisenatom wird über eine Kette von Elektronenüberträgern wie Tetrahydrobiopterin, Calmodulin, Flavinmononukleotid und Flavin-Adenin-Dinukleotid reduziert. Im reaktiven Zentrum an den Hämgruppen im Inneren des NOS-Dimers, wo sich ein Elektronenloch bildet, werden die Elektronen zur Reduktion des Arginins übertragen (MCMILLAN *et al.*, 1992; WHITE & MARLETTA, 1992). Der NOS-Homodimer mit einer N-terminalen Reduktase- und einer C-terminalen Oxygenase-Domäne in jedem Monomer wird durch die gebundene Aminosäure L-Arginin (SIDDANTHA *et al.*, 1998; SENNEQUIER *et al.*, 1999) und ( $\text{Ca}^{2+}$ -)Calmodulin(-Komplexe) (HELLERMANN & SOLOMONSON, 1997; GERVAZIEV & SOKOLOV, 1999) stabilisiert und die NOS-Einheiten weiterhin durch 5,6,7,8-Tetrabiopterin ( $\text{BH}_4$ ) auf noch unbekannte Weise so zueinander ausgerichtet, dass ihre katalytischen Eigenschaften entstehen (SIDDANTHA *et al.*, 1998; SENNEQUIER *et al.*, 1999; MAYER & WERNER, 1995). Calmodulin spielt zudem eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Enzymaktivität der konstitutiv exprimierten NO-Synthasen. Erst nach Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann es als  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex an die konstitutiven NO-Synthasen nNOS und eNOS binden und vermutlich über eine Konformationsänderung der NOS den Elektronenfluss vom FMN in der Reduktasedomäne der einen Dimer-Untereinheit zum Häm in der Oxygenasedomäne der anderen Dimer-Untereinheit ermöglichen (SIDDANTHA *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu kann die iNOS Calmodulin auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  binden und somit  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig NO produzieren (STUEHR *et al.*, 1991). Die Diversität der drei Isoformen der NO-Synthase liegt einerseits in der zellspezifischen Lokalisation und des zellulären Wirkortes, andererseits auch in der Effektivität der NO-Bildung durch die jeweilige NO-Isoform begründet. In murinen Makrophagen konnte unter ausreichender Substratversorgung und wiederholter Induktorgabe eine über fünf Tage andauernde NO-Bildung der iNOS beobachtet werden (MACMICKING *et al.*, 1997; siehe Tabelle 1-1).



**Abbildung 1-1: Schematische Darstellung von Struktur und Funktion der NO-Synthasen.** NO-Synthasen sind erst nach einer durch 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), L-Arginin oder/und Calmodulin (CaM)-vermittelten Homodimerisierung katalytisch aktiv. Die monomeren Untereinheiten bestehen funktionell aus zwei Domänen: der Flavin-Adenin-Dinukleotid- (FAD)-, Flavin-Mononukleotid-(FMN)- und Calmodulin(CaM)-tragenden Reduktasedomäne (eckig) am C-Terminus sowie der Häm, 5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und L-Arginin (Arg) enthaltenden Oxygenasedomäne am N-Terminus (Siddantha, U. et al., 1998). In zwei sequentiellen Monooxygenase-

no-Stickstoff der basischen Aminosäure L-Arginin (Arg) über das Zwischenprodukt N<sup>G</sup>-Hydroxy-L-Arginin (N<sup>G</sup>-OH-L-Arg) zu Stickstoffmonoxid (NO), L-Citrullin und Wasser (H<sub>2</sub>O).

Mit Molekulargewichten von 130 bis 160 kDa stellen die drei NOS-Isoformen relativ große Proteine dar. Sie werden von drei verschiedenen Genen kodiert, die auf den Chromosomen 12

Isoform	mRNA-Größe	Protein-Größe	Lokalisation	Enzym-Regulation	Gebildete NO-Menge	Literatur
nNOS	~10 kb	1433 AS, 161 kDa	Cytosol und Membran*	Ca <sup>2+</sup> , Calmodulin	wenig	(NAKANE <i>et al.</i> , 1993)
iNOS	~4,5 kb	1203 AS, 133 kDa	Cytosol >> Membran**	keine; Expressions-reguliert	viel	(SHERMAN <i>et al.</i> , 1993; GELLER <i>et al.</i> , 1993)
eNOS	~4,8 kb	1153 AS, 131 kDa	Membran >> Cytosol	Ca <sup>2+</sup> , Calmodulin	wenig	(MARSDEN <i>et al.</i> , 1992; JANSSENS <i>et al.</i> , 1992)

**Tabelle 1-1: Charakterisierung der humanen NOS-Isoformen.**

\* je nach Zelltyp (RODRIGO *et al.*, 1997; HECKER *et al.*, 1994)

\*\* in murinen Makrophagen, im Skelettmuskel jedoch umgekehrt (GATH *et al.*, 1996)

(nNOS), 17 (iNOS) und 7 (eNOS) lokalisiert sind. Die von den cDNAs abgeleiteten Aminosäuresequenzen der humanen NOS-Isoenzyme weisen untereinander eine Homologie von weniger als 59 % auf. Vergleicht man hingegen die einzelnen Isoformen unterschiedlicher Spezies miteinander, so ergibt sich eine Sequenzidentität von mehr als 90 % für die nNOS und die eNOS sowie eine von mehr als 80 % für die iNOS (FÖRSTERMANN *et al.*, 1994). Dies spricht für eine frühe Diversität der Gene der Isoformen aus einer Grundform, wobei sich die Isoform innerhalb verwandter Spezies konservierte. Somit können die NO-Synthasen als hoch-konservierte Enzyme angesehen werden. In Bezug auf die subzelluläre Lokalisation sind nNOS und iNOS vorwiegend in der zytosolischen Fraktion anzutreffen. Im Gegensatz dazu ist die eNOS aufgrund der Myristylierung eines N-terminalen Glycins (POLLOCK *et al.*, 1992) zu über 90 % membranständig (FÖRSTERMANN *et al.*, 1991).

### **1.2.1 Konstitutive Formen der NO-Synthase**

Die neuronale NOS wurde zunächst als ein konstitutiv exprimiertes Enzym betrachtet, dessen Aktivität durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kontrolliert wird (FÖRSTERMANN *et al.*, 1990; SCHMIDT *et al.*, 1991). Es verdichten sich jedoch die Hinweise darauf, dass sie durch diverse physiologische und pathophysiologische Stimuli auch auf Ebene der Transkription reguliert werden kann (FÖRSTERMANN *et al.*, 1998). Die gewebe- und/oder zellspezifische Verwendung unterschiedlicher Promotoren und mRNA-Splicing-Varianten lässt die expressionelle Regulation der nNOS sehr komplex erscheinen (BOISSEL *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1997; XIE *et al.*, 1995).

Die eNOS, die zuerst in Aorten-Endothelzellen von Rindern gefunden wurde, wird überwiegend in Endothelzellen exprimiert (POLLOCK *et al.*, 1993). Sie lässt sich allerdings auch in zahlreichen nicht-endothelialen Zellen nachweisen, so z.B. in Thrombozyten (WALLERATH *et al.*, 1997; SASE & MICHEL, 1995), T-Zellen (REILING *et al.*, 1996), Hepatozyten (ZIMMERMANN *et al.*, 1996), Epithelzellen der Lunge (SHAUL *et al.*, 1994) und Niere (TRACEY *et al.*, 1994), Fibroblasten (WANG *et al.*, 1996) sowie in bestimmten Neuronen (ABE *et al.*, 1997; DINERMAN *et al.*, 1994) und in Spermien (ZINI *et al.*, 1996). Aufgrund seines vasodilatatorischen Effekts ist endotheliales NO (gemeinsam mit dem aus nitrergen Nerven freigesetzten NO) ein bedeutsamer Gegenspieler der physiologischen Vasokonstriktoren Noradrenalin (sympathisches Nervensystem) und Angiotensin II (Renin-

Angiotensin-Aldosteron-System). Dementsprechend führte ein Mangel an endothelialem NO in Mäusen mit zerstörtem eNOS-Gen (eNOS-Knock-out; eNOS<sup>(-/-)</sup>) zu erhöhten Blutdruckwerten (HUANG *et al.*, 1995), während transgene, eNOS-überexprimierende Mäuse verglichen mit Wildtyp-Mäusen verminderte Blutdruckwerte aufwiesen (OHASHI *et al.*, 1998). Wie bei der nNOS, musste man auch für die eNOS die Vorstellung von einem konstitutiv exprimierten, allein durch die Höhe der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration regulierten Enzym revidieren, weil neuere Forschungsergebnisse für eine Regulation auch auf transkriptioneller Ebene sprachen (FÖRSTERMANN *et al.*, 1998). Beispielsweise führten durch das fließende Blut auf die Endothelzellen einwirkende Scherkräfte (shear stress) zu einer verstärkten eNOS-Expression (LAMONTAGNE *et al.*, 1992; NISHIDA *et al.*, 1992; UEMATSU *et al.*, 1995). Ebenfalls steigenden Einfluss auf die Expression der eNOS hatten Schwangerschaft (WEINER *et al.*, 1994; GOETZ *et al.*, 1994) und Östrogen-Behandlung (HISHIKAWA *et al.*, 1995; ARMOUR & RALSTON, 1998; KLEINERT *et al.*, 1998). Dagegen bewirkte Hypoxie in Pulmonalarterien-Endothelzellen eine Reduktion der eNOS-Expression (ZIESCHE *et al.*, 1996; DAI *et al.*, 1995; LIAO *et al.*, 1995) - ein Mechanismus, der möglicherweise an der pulmonalen Ventilations-Perfusions-Kopplung beteiligt ist.

### **1.2.2 Die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS2)**

Die iNOS wird normalerweise nicht konstitutiv, sondern nur nach Induktion exprimiert, weshalb sie in unstimulierten Zellen nicht oder nur in sehr geringer Konzentration zu finden ist. Bakterielle Endotoxine, wie z.B. Lipopolysaccharid (LPS; Bestandteil der Wand gramnegativer Bakterien), und/oder proinflammatorische Cytokine können in Makrophagen und auch anderen untersuchten Zellen wie Lungen-Alveolar- oder auch Kolon-Karzinom-Zellen die iNOS-Expression induzieren (HEVEL *et al.*, 1991; STUEHR *et al.*, 1991).

Durch die Ca<sup>2+</sup>-unabhängige Produktion großer NO-Mengen kommt es in Nachbarschaft NO-produzierender Zellen zur Abtötung von Zellen infolge der Wirkung des NO auf die DNA-Synthese und physiologische zelluläre Prozesse, die zum Absterben der Zielzellen führen.

NO-bildende Makrophagen benutzen die von NO verursachte Zytotoxizität als Abwehrmechanismus gegen Bakterien, Pilzen, Parasiten und Tumorzellen dar. Die cDNA der iNOS wurde erstmals aus murinen Makrophagen kloniert (LOWENSTEIN *et al.*, 1992; XIE *et al.*, 1992; LYONS *et al.*, 1992), später auch aus glatten Muskelzellen (NUNOKAWA

*et al.*, 1993) und Hepatozyten (WOOD *et al.*, 1993) der Ratte, aus Chondrozyten (CHARLES *et al.*, 1993) und Hepatozyten (GELLER *et al.*, 1993) des Menschen sowie aus der humanen kolorektalen Adenocarcinomzelllinie DLD1 (SHERMAN *et al.*, 1993). In mit Propionibakterien und LPS behandelten Ratten konnte in zahlreichen somatischen Zellen erhöhte iNOS-Expression gefunden werden, unter anderem in Alveolarmakrophagen, Kupfferschen Sternzellen, Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Mastzellen sowie in Endothelzellen der Niere, der Leber und des Colons (BANDALTOVA *et al.*, 1993). Eine konstitutive Expression der "induzierbaren" NO-Synthase fand man im Bronchialepithel von Ratte und Mensch (KOBZIK *et al.*, 1993; GUO *et al.*, 1995), im Dünndarmepithel des Ileums der Maus (HOFFMAN *et al.*, 1997) sowie in Skelettmuskelzellen von Meerschweinchen (GATH *et al.*, 1996). Da die iNOS als  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängiges Enzym nach ihrer Synthese bis zur Degradation permanent aktiv ist, entsteht etwa 1000mal so viel NO wie bei den beiden anderen Isoformen. In derart hoher Konzentration kann NO, bedingt durch seine Affinität zu Protein-gebundenem Eisen, das katalytische Zentrum zahlreicher essentieller Enzyme und damit das Wachstum unerwünschter Umgebungszellen blockieren. Dazu gehören die Ribonukleotid-Reduktase als Schlüsselenzym der DNA-Synthese, die jeweils mehrere Eisen-Schwefel-Zentren aufweisenden Enzyme NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase und Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I und II der Atmungskette) sowie die *cis*-Aconitase (im Citratzyklus) (NATHAN & HIBBS, 1991). Es konnte auch gezeigt werden, dass Cytokin-aktivierte Endothelzellen Tumorzellen lysieren (LI *et al.*, 1991) und induzierte Hepatozyten durch NO-Freisetzung in der Lage sind, Malaria-Sporozoiten abzutöten (GREEN *et al.*, 1990). NO stellt somit einen essentiellen Bestandteil der unspezifischen Immunabwehr dar (KRÖNCKE *et al.*, 1998; MACMICKING *et al.*, 1997). Daneben scheint das von der iNOS produzierte NO eine wichtige Rolle in der Wundheilung zu spielen, indem es die Synthese von VEGF (Vascular endothelial growth factor) und Kollagen steigert (FRANK *et al.*, 1998; THORNTON *et al.*, 1998). Mäuse mit zerstörtem iNOS-Gen (iNOS-Knock-out; iNOS<sup>(-/-)</sup>) wiesen eine verzögerte Wundheilung auf, die durch adenoviralen Retransfer des iNOS-Gens wieder normalisiert werden konnte (YAMASAKI *et al.*, 1998). Von der iNOS-produziertes NO scheint zudem in bestimmten Situationen in der Lage zu sein, einer Leberschädigung entgegenzuwirken (BOHLINGER *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 1997; HARBRECHT *et al.*, 1997; LI & BILLIAR, 1999). Ferner scheint die iNOS im Zustand der Sepsis in der Niere (MARKEWITZ *et al.*, 1993) und im Darm (MACKENDRICK *et al.*,

1993) eine protektive Funktion zu haben. In pathophysiologischen Zuständen kann sich das zytotoxische Potential des iNOS-produzierten NO's, das normalerweise der unspezifischen Immunabwehr dient, jedoch gegen körpereigene Zellen richten und zur Pathogenese zahlreicher Autoimmunerkrankungen beitragen (KRÖNCKE *et al.*, 1998). So spielt von der iNOS gebildetes NO bei der Zerstörung der Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas beim juvenilen Diabetes (Typ I) eine entscheidende Rolle (CORBETT & MCDANIEL, 1992; KOLB-BACHOFEN, 1996). Zudem ist es beispielsweise bei der Rheumatoiden Arthritis (STICHTENOTH & FRÖLICH, 1998), bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa und Morbus Crohn) (KIMURA *et al.*, 1998; SINGER *et al.*, 1996), der Multiplen Sklerose (DE GROOT *et al.*, 1997; BAGASRA *et al.*, 1995) sowie beim Systemischen Lupus erythematoses und bei bestimmten Glomerulonephritiden und Vasulitiden (FÖRSTERMANN *et al.*, 1994; MULLIGAN *et al.*, 1991) an der Entstehung von Entzündungssymptomen und Gewebsschädigungen beteiligt. Große Mengen iNOS waren außerdem im Bronchialepithel von Asthma-Patienten zu finden, wobei das Ausmaß der iNOS-Expression mit der Schwere der Erkrankung korrelierte (BARNES, 1996; HAMID *et al.*, 1993). Durch Inhalation von Glucocorticoiden konnte - parallel zur Entzündungsreduktion - eine Reduktion der gesteigerten iNOS-Expression im Bronchialepithel und der bei Asthma-Patienten ebenfalls erhöhten NO-Konzentration in der Expirationsluft erreicht werden (KHARITONOV *et al.*, 1996; GUO *et al.*, 2000). Auch bei der unspezifischen Gewebeabstoßungsreaktion scheint von der iNOS produziertes NO ein wichtiger Mediator zu sein (LANGREHR *et al.*, 1991).

Schließlich scheint der im septischen Schock zu beobachtende massive Blutdruckabfall hauptsächlich auf von der iNOS gebildetes NO zurückzuführen sein. Bei der trotz intensivmedizinischer Maßnahmen in etwa 50 % tödlich verlaufenden Sepsis kommt es zur Aussaat meist gramnegativer Bakterien in die Blutbahn. Das in ihrer Wand enthaltene LPS selbst bzw. die in Leukozyten auf den LPS-Stimulus hin gebildeten Cytokine induzieren in der glatten Muskulatur der Gefäßwand die Expression der iNOS. Das von ihr synthetisierte NO wirkt über den gleichen Mechanismus wie das unter physiologischen Bedingungen von der eNOS im Endothel gebildete NO vasodilatatorisch. Da jedoch durch die iNOS drei Zehnerpotenzen höhere NO-Konzentrationen erreicht werden, nimmt die Vasodilatation ein Ausmaß an, das zu schwerer Hypotension und Mikrozirkulationsstörungen führt und letztlich in ein Multiorganversagen münden kann. Diese Vorstellungen von der Pathogenese des Blutdruck-

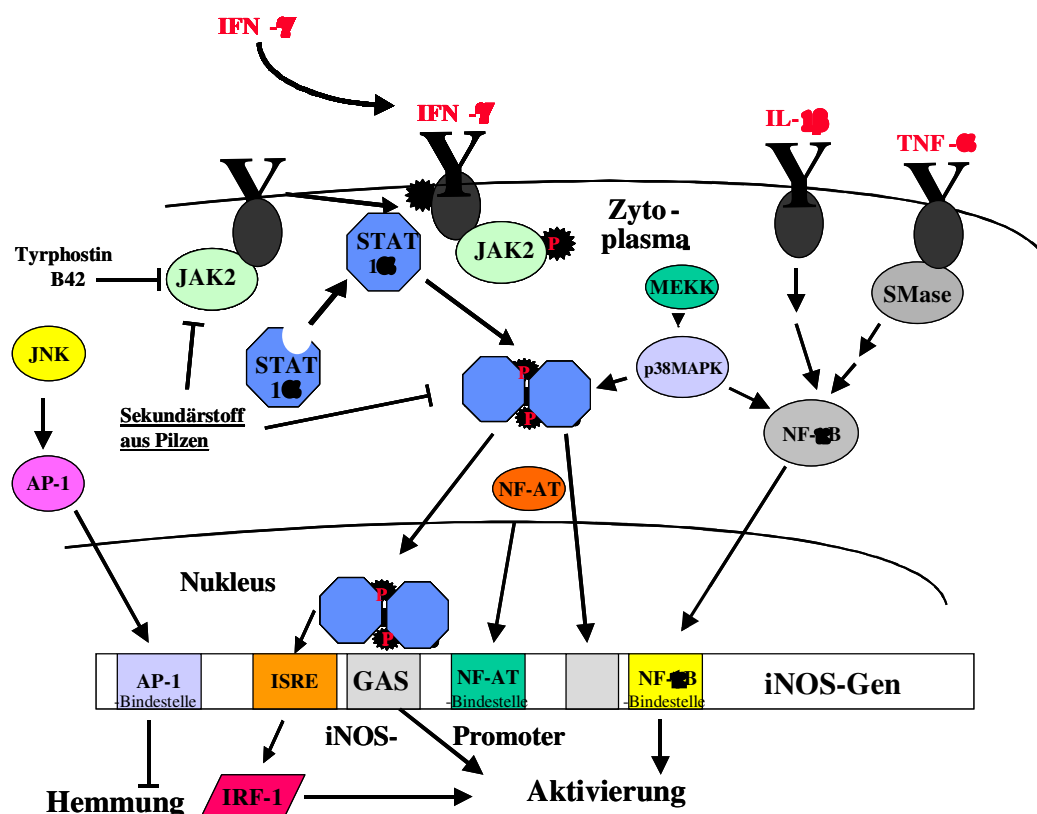
abfalls im septischen Schock werden gestützt durch *in vitro*-Experimente, bei denen durch IL-1 und TNF- $\alpha$  in glatten Muskelzellen eine iNOS-Expression induziert werden konnte (BUSSE & MÜLSCH, 1990), sowie durch *in vivo*-Studien, bei denen eine Endotoxin-induzierte Hypotonie durch NOS-Inhibitoren wie Arginin-Analoga wieder aufhebbar war (KILBOURN *et al.*, 1990). Eine klinische Studie in terminal kranken Patienten zeigte darüberhinaus, dass N<sup>G</sup>-Methyl-L-Arginin oder N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin beim Menschen im septischen Schock zur Blutdruckstabilisierung führt (PETROS *et al.*, 1991). Weiterhin liefert der beschriebene Mechanismus eine Erklärung dafür, dass unter IL-2-Therapie stehende Melanom- und Nieren-Carcinom-Patienten neben einem erhöhten TNF- $\alpha$ -Plasma-Spiegel auch eine Erhöhung der Nitrat-Konzentration in Plasma und Urin aufweisen und gleichzeitig an einer Therapie-bedingten Hypotonie leiden (HIBBS *et al.*, 1992). Infolge der im Blut zirkulierenden Cytokine kommt es offensichtlich zur Induktion der iNOS-Expression in der Gefäßwand. Nach Ausübung seines vasodilatatorischen Effekts wird das von der iNOS produzierte NO zu Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) oxidiert und als solches renal eliminiert. Eine eventuelle Bedeutung des von der iNOS produzierten NO's in der Tumorentwicklung wird derzeit kontrovers diskutiert. Noch ist unklar, ob NO einen wirksamen Abwehrmechanismus gegen das Tumorwachstum darstellt oder ob es die Vaskularisation, Perfusion und damit Proliferation von Tumoren fördert (CHINJE & STRATFORD, 1997). Während beim murinen Retikulumzell-Sarkom eine hohe iNOS-vermittelte NO-Produktion mit einer verringerten Metastasierungsrate einherging (XIE *et al.*, 1995), fand man beim humanen Mamma-Carcinom eine positive Korrelation zwischen iNOS-Expression und der Metastasierung in die axillären Lymphknoten (DUENAS-GONZALEZ, A. *et al.*, 1997).

### **1.3 Transkriptionelle Regulation der iNOS-Expression über unterschiedliche Signaltransduktionswege**

Die iNOS kann nicht Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-abhängig reguliert werden, sie wird im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten NO-Synthasen vielmehr über transkriptionelle sowie posttranskriptionelle Prozesse reguliert (FÖRSTERMANN & KLEINERT *et al.*, 1995; GELLER & BILLIAR, 1998). Während die iNOS in murinen Zellen wie Makrophagen und anderen Zellen des hämatopoetischen Systems nach Induktion durch IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  oder IL-6 gebildet wird, so erreicht man dies in den meisten humanen Zellen *in vitro* nur mit



einer Cytokinkombination bestehend aus IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (FÖRSTERMANN & KLEINERT, 1995). Als Induktoren der iNOS in verschiedenen Zellen unterschiedlicher Spezies fand man neben LPS und inflammatorischen Cytokinen auch die cAMP-erhöhenden Substanzen, (z.B. Forskolin, 8-Bromo-cAMP und Dibutyryl-cAMP) (KOIDE *et al.*, 1993; EBERHARDT *et al.*, 1998), Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF und FGF) (GILBERT & HERSCHMAN, 1993 a; KUNZ *et al.*, 1997) und Proteinkinase C-Aktivatoren (z.B. TPA) (HORTELANO *et al.*, 1993; KLEINERT *et al.*, 1996). Anti-inflammatorische Cytokine (z.B. IL-4 (BOGDAN *et al.*, 1994; SANDS *et al.*, 1994), Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- $\beta$  1, 2, 3 (DING *et al.*, 1990; VODOVOTZ *et al.*, 1993)), IL-10 (CUNHA *et al.*, 1992; MACMICKING *et al.*, 1997) und IL-13 (SAURA *et al.*, 1996; WRIGHT *et al.*, 1997) sind Hemmer der iNOS-Induktion. Auch Pharmaka wie Tyrosinkinase-Inhibitoren (z.B. Genestein, Herbimycin A und Tyrphostin (DONG *et al.*, 1993), Inhibitoren des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (z.B. Pyrrolidindithiocarbamat (SHERMAN *et al.*, 1993) und Diethyldithiocarbamat (MÜLSCH *et al.*, 1993)) sowie die Glucocorticoide (KLEINERT *et al.*, 1996; DE VERA *et al.*, 1997; KUNZ *et al.*, 1996) haben eine negativ regulierende Funktion für die iNOS. Allerdings ist die Wirkung Zelltyp- und von der Spezies abhängig. So sind TGF- $\beta$  und PDGF-AB und -BB in murinen Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen Inhibitoren der iNOS-Induktion (FÖRSTERMANN *et al.*, 1992; DING *et al.*, 1990, SCHINI *et al.*, 1992; GILBERTS & HERSCHMAN, 1993 b), während sie in murinen 3T3-Fibroblasten jedoch Stimulatoren (GILBERT und HERSCHMAN, 1993 a; GILBERT & HERSCHMAN, 1993 b, KLEINERT *et al.*, 1996) sind. Viele Wege zur Beeinflussung der Expression der murinen iNOS laufen über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Dies wurde z. B. für murine 3T3-Fibroblasten für den JAK-STAT-Signaltransduktionsweg (JAK-Tyrosinkinasen), den cAMP-Proteinkinase A-(PKA)- und den Proteinkinase C-(PKC)-Weg nachgewiesen (KLEINERT *et al.*, 1996). Nach Aktivierung des Signalmoleküls NF- $\kappa$ B und dessen Translokation in den Zellkern (LÖFFLER, 1997) entfaltet es seine aktivierende Wirkung auf die mRNA-Expression der iNOS. Die cAMP-induzierte iNOS-Expression in Ratten-Mesangial-Zellen konnte mit dem NF- $\kappa$ B-Inhibitor PDTC nicht inhibiert werden (EBERHARDT *et al.*, 1994), was die Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren wie z. B. CREB (cAMP response-element binding protein) (EBERHARDT *et al.*, 1998) wahrscheinlich macht. Dieser ist nur nach Phosphorylierung durch die in den Kern translozierte PKA aktiv (LÖFFLER, 1997). In den Makrophagen von IRF-1<sup>(-/-)</sup> - (KAMIJO *et al.*, 1994;



**Abbildung 1-2: Aktivierung des humanen iNOS-Promotors** durch die STAT-1 $\alpha$ -Dimer-Bindung an GAS-Sequenzen innerhalb des iNOS-Promotors als zentraler Aktivierungsweg in humanen Zellen. Die Suche nach Inhibitoren der iNOS-Expression aus Pilzen zielt auf die Inaktivierung eines der am JAK-STAT-Weg beteiligten Signalmoleküle.

Proteinkinasen: JAK – Janus-Kinase; JNK – Jun-terminal-Kinase; MEKK – MAPK-Kinase; p38MAPK – p38 mitogen-activated-protein-Kinase. Sonstige membranständige Enzyme: SMase – Sphingomyelinase. Enhancer: ISRE – Interferon-sensitive-response-element; GAS-  $\gamma$ -interferon-activated-site. Effektoren: AP-1 – Activator-Protein-1; STAT-1 $\alpha$  – Signal-Transducer-and-Activator-of-Transcription-1 $\alpha$ ; NFAT – Nuclear-factor-of-Activated-T-cells; NF- $\kappa$ B – Nuclear-Factor- $\kappa$ B; IRF-1 – Interferon-Related-Factor-1. Cytokine: IFN- $\gamma$  – Interferon- $\gamma$ ; IL-1 $\beta$  – Interleukin-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$  – Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ .

SHIRAISHI *et al.*, 1997) und STAT1 $\alpha^{(-/-)}$  (MERAZ *et al.*, 1996) -Mäusen liegt ein Fehlen der iNOS vor. Dies weist auf die große Bedeutung der IFN- $\gamma$ -induzierten Transkriptionsfaktoren IRF-1 und STAT-1 $\alpha$  hin, wobei IRF-1 nur STAT-1 $\alpha$ -abhängig eine Wirkung auf die iNOS-Expression zu haben scheint (SHIRAISHI *et al.*, 1997; BOEHM *et al.*, 1997; KLEINERT *et al.*, 1998). Damit übereinstimmend wurde bei Asthma-Patienten neben einer erhöhten IFN- $\gamma$ -Konzentration in der BAL (Broncho-alveoläre Lavage) und einer verstärkten Abatmung von NO eine gesteigerte iNOS-mRNA-Expression im Bronchialepithel gefunden, die mit einer STAT-1 $\alpha$ -Aktivierung assoziiert war und *in vitro* mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein gehemmt werden konnte (FUHUA *et al.*, 2000).

Der durch Zusammenlagerung der beiden Proteine c-jun und c-fos gebildete Transkriptionsfaktor AP-1 scheint dagegen eher einen negativen Einfluss auf die iNOS-Expression zu haben. In humanen DLD1- und A549/8-Zellen führte seine Überexpression durch die Kotransfektion von c-jun- und c-fos-Expressionsvektoren zu einer verminderten iNOS-Promotoraktivität (KLEINERT *et al.*, 1998; KLEINERT *et al.*, 1999). Überexpression des Tumorsuppressorgens p53 resultierte in einer Hemmung der Aktivität des humanen iNOS-Promotors (FORRESTER *et al.*, 1996), während p53<sup>(-/-)</sup>-Mäuse eine gegenüber Wildtyp-Mäusen erhöhte iNOS-Expression zeigten (AMBS *et al.*, 1998). Dass in humanen Zellen umgekehrt unter der Behandlung mit NO-Donoren eine gesteigerte p53-Protein-Expression zu beobachten war, lässt das Vorliegen eines negativen Rückkopplungsmechanismus vermuten (FORRESTER *et al.*, 1996).

### **1.3.1 Regulation der iNOS-Promotoraktivität (transkriptionelle Kontrolle)**

Die in der 5'-flankierenden Region für die Bindung der Transkriptionsfaktoren notwendigen Konsensussequenzen (NF- $\kappa$ B-, AP-1-, HIF-1-, p53-Bindungsstellen, CRE, ISRE, GAS) stellen funktionell wichtige Einheiten des iNOS-Promotors dar. Obwohl sich kein Glucocorticoid-Rezeptor-responsives Element (GR-RE) (CHU *et al.*, 1998; LOWENSTEIN *et al.*, 1993; XIE *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 1998) innerhalb des Promotors fand, lässt sich durch Glucocorticoide ausgelöste die Hemmung der iNOS-Expression entweder durch erhöhte I- $\kappa$ B-Expression (DE VERA *et al.*, 1997), NF- $\kappa$ B-Interaktion mit dem aktiven Glucocorticoid-Rezeptor (KLEINERT *et al.*, 1996) oder aber durch posttranskriptionelle Mechanismen (CETKOVIC-CVRLJE, M. *et al.*, 1993; KUNZ *et al.*, 1996) erklären. Homologien ergaben sich im Sequenzvergleich Maus, Ratte und Mensch innerhalb der ersten 1000 bp der iNOS-Promotoren von Maus, Ratte und Mensch. Trotz der nur maximal 73%igen Homologie ergibt sich bezüglich der Lage der putativen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für alle drei Mammalier-Promotoren eine große Übereinstimmung. Um so erstaunlicher ist es, dass sich die 1000 bp iNOS-Promotor-Fragmente der Nager bei Transfektions-Experimenten in Zellen homologer (LOWENSTEIN *et al.*, 1993; XIE, 1993) wie heterologer (KLEINERT *et al.*, 1996) Spezies als voll funktionsfähig erwiesen, während das humane 1000 bp iNOS-Promotor-Fragment in humanen Zellen zwar eine basale Aktivität zeigte, jedoch durch Cytokine nicht induzierbar war (DE VERA *et al.*, 1996; LINN *et al.*, 1997; CHU *et al.*, 1998).

Nach Transfektion in heterologe RAW 264.7-Macrophagen wurde dagegen eine deutliche Induzierbarkeit des humanen 1000 bp iNOS-Promotor-Fragments durch LPS, IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  gefunden (KOLYADA *et al.*, 1996). Durch ‘Nuclear-Run-On’-Experimente in humanen AKN1- und DLD1-Zellen (RODRIGUEZ-PASCUAL *et al.*, 2000), die eine basale Aktivität des Promotors in isolierten Zellkernen belegten, und Deletionsanalysen in AKN1-Zellen (DE VERA *et al.*, 1996) konnte gezeigt werden, dass die für die Cytokin-Antwort essentiellen Konsensussequenzen hauptsächlich zwischen -7,0 und -16,0 kb zu suchen sind.

### **1.3.2 Regulation der Expression über die Änderung der iNOS-mRNA-Stabilität (post-transkriptionelle Kontrolle)**

Neben der Steuerung der iNOS-Expression auf transkriptioneller Ebene wurde in einigen Publikationen auf die posttranskriptionelle Regulation verwiesen. Eine Steigerung der iNOS-Expression durch LPS sei nicht nur auf die Änderung der RNA-Synthese, sondern auch auf eine mehrfach verlängerte Lebensdauer der mRNA und damit auf erhöhte iNOS-Protein-Synthese durch mRNA-Akkumulation zurückzuführen (WEISZ *et al.*, 1994). In murinen Peritoneal-Makrophagen ging die Hemmung der iNOS-Induktion durch den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  zwar mit einer Reduktion der iNOS-mRNA einher, jedoch nicht mit einer Änderung der Transkriptionsrate. Die Erklärung liegt in post-transkriptionellen Mechanismen.

Einer der drei möglichen Mechanismen ist die Destabilisierung oder Stabilisierung der mRNA z.B. durch Tetrahydrobiopterin (LINSCHIED *et al.*, 1998), einer Reduktion der iNOS-mRNA-Translation sowie einem gesteigerten Proteinabbau (VODOVOTZ *et al.*, 1993). Man fand bei Sequenzanalysen der 3'-flankierenden Region der humanen iNOS-mRNA viermal das Sequenzmotiv (AUUUA) (GELLER *et al.*, 1993) wie auch in der entsprechenden Ratten-mRNA (GALEA *et al.*, 1994) und zweimal in der entsprechenden Mäuse-mRNA (LYONS *et al.*, 1992). Diese AU-reichen Abschnitte innerhalb der Transkripte fungieren als Bindungsstellen RNA-bindender Proteine, die die mRNA-Stabilität beeinflussen (z. B. HuR, AUF-Proteine). In Transfektionsexperimenten mit humanen A549/8- und DLD1-Zellen führte die 3'-untranslatierte Region der humanen iNOS-mRNA mit diesen destabilisierenden Sequenzmotiven zu einem Abbau der Luziferase-Reportergen-mRNA (RODRIGUEZ-PASCUAL *et al.*, 2000). Die dort bindenden RNA-Bindeproteine sind möglicherweise AUF-1 als wohl eher destabilisierender Faktor (LAROIA *et al.*, 1999) und HuR, das als ELAV-

Protein eine stabilisierende Funktion zeigt (FAN & STEITZ, 1998). HuR bindet in Gelretentions-Analysen an die 3'-UTR-Sequenz der humanen iNOS-mRNA (RODRIGUEZ-PASCUAL *et al.*, 2000). Transfektionsexperimente mit überexprimiertem HuR-Protein zeigten eine Erhöhung der iNOS-Expression. Das bestätigt die Annahme, dass HuR an der Regulation der Expression der humanen iNOS als stabilisierender Faktor beteiligt sein könnte.

#### **1.4 Rolle der Cyclooxygenase-2 im Entzündungsgeschehen**

Die induzierbare Cyclooxygenase (COX-2) ist wie die iNOS ein unter LPS und Cytokinen induzierbares Enzym, welches im Falle einer Sepsis oder von Traumata in unterschiedlichen Zelltypen gebildet wird. Arachidonsäure ist ähnlich dem Stickstoffmonoxid-Molekül relativ kurzlebig und wird nach Aufnahme in die Zelle zu unterschiedlichen Mediatoren metabolisiert. Der Arachidonsäuremetabolismus verläuft entweder in Richtung der Leukotriene oder über die Reaktion mit der Cyclooxygenase, wobei Prostanoiden gebildet werden. Ist ein Weg gehemmt, so kommt es meist zur vermehrten Bildung der anderen Stoffklasse. Prostacyclin ist ein abgeleitetes Prostaglandin, da es durch seine Funktion enger mit dem Thromboxan verbunden ist und als Antagonist bei dessen Funktion der Thrombozytenaggregation fungiert. Die Mediatoren werden hauptsächlich von zwei Zelltypen, den Mast- und den basophilen Zellen ausgeschüttet, die im Vergleich zu anderen Zelltypen wie Eosinophilen und Thrombozyten ein viel ausgeprägteres System von Plasmamembranrezeptoren besitzen. Die Fc-Untereinheiten der IgE-Antikörper, die bei einigen Individuen vermehrt ausgeschüttet werden, reagieren mit Rezeptoren, die in Zielzellen dann die Produktion und Ausschüttung großer Mengen an Mediatoren bei der allergischen Reaktion bewirken (OKAYAMA *et al.*, 2001). Glucocorticoide hemmen die Expression der induzierbaren, für die am Entzündungsgeschehen beteiligten Zellen typischen COX-2. Durch die Hemmung der Prostanoidsynthese kann ein entzündliches Geschehen, wie z. B. durch Glucocortikoide in humanen Monocyten gezeigt, therapeutisch beeinflusst werden (SANTINI *et al.*, 2001). Zur Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen kamen bisher vor allem Hemmstoffe zum Einsatz, die sowohl die konstitutiv exprimierte Cyclooxygenase-1 sowie die induzierbare, nur in Entzündungszellen exprimierte COX-2 hemmen. Diese nicht-steroidalen Antiphlogistika wie Aspirin (Acetylsalicylsäure) und Indomethacin konkurrieren mit der Arachidonsäure um die Cyclooxygenase-Bindungsstelle. Acetylsalicylsäure acetyliert zudem den für die Oxidations-

reaktion am wichtigen C15-Serinrest des Enzyms. Die Isoformen der Cyclooxygenase haben verschiedene Expressionsmuster in bestimmten Geweben, woraus ihre jeweiligen Funktionen resultieren. Bei unselektiver Blockierung der Isoenzyme COX-1 und COX-2 kommt es zu einer Beeinträchtigung der physiologisch wichtigen Eigenschaften insbesondere die der COX-1. Die Hemmung der COX-2, die durch nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente (NSAID's) bewirkt wird, ist für die antiphlogistische und analgetische Aktivität verantwortlich, während parallel dazu auftretende Magenblutungen COX-1-spezifische Effekte, also eine unerwünschte Nebenwirkung, sind. Konkurrierende Hemmung dieses Isoenzym führt Prostaglandin-unabhängig zur Einschränkung der gastroduodenalen Schutzfunktion und der Plättchenaggregation (VERBURG *et al.*, 2001). Um die Funktion des konstitutiv wirkenden Geschwisterenzym COX-1 nicht zu beeinträchtigen sollten selektive Inhibitoren für das induzierbare Enzym COX-2 gefunden werden. In Anknüpfung an die positive Entwicklung bezüglich chemisch hergestellter COX-2-Hemmer wie z. B. Meloxicam (Thomae) bietet es sich geradezu an, auch natürlich vorkommende Substanzen hinsichtlich einer Inhibition von Promotoren entzündungsspezifisch relevanter Enzyme, selektiv für die induzierbare COX-Isoform, zu testen. Durch zielgerichtete Aufreinigung von den COX-2-Promotor hemmende Substanzen aus Organismen wie Pilzen böte sich eine neue Therapiemöglichkeit zur Behandlung chronischer entzündungsunterhaltender Prozesse. Angriffspunkte für die Inhibitoren könnten funktionelle Untereinheiten der Promotorregion der humanen COX-2 sein, die ein cAMP-responsives Element (CRE-Element) in der 275 bp-Region oberhalb der Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle enthält (KOSAKA *et al.*, 1994). Auch im murinen (FLETCHER *et al.*, 1992) und im Ratten-Promotor (YAMAMOTO *et al.*, 1995) wurden diese Konsensus-Sequenzen gefunden. Außerdem war 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) als PKC-Aktivator in der Lage, die COX-2-Promotoraktivität zu steigern und die DNA-Protein-Bindung von NF- $\kappa$ B zu stimulieren. Der Einsatz eines spezifischen NF- $\kappa$ B-Blockers wie Pyrollidindithiocarbamat (PDTC) bewirkt eine Inhibition der TNF- $\alpha$ -induzierten COX-2-Expression und der NF- $\kappa$ B-spezifischen DNA-Protein-Bindung. PDTC kann auch die TPA- und TNF $\alpha$ - induzierte COX-2-Promotoraktivität zum Teil hemmen (CHEN *et al.*, 2000). Die Regulation der COX-2-Genexpression erfolgt nach der Induktion mit Cytokinen und Wachstumsfaktoren auch wie bei der NO-Synthase (später angesprochen) zumindest in murinen 3T3-Zellen über kleine G-Proteine wie Ras- oder Rho-Proteine (SLICE *et al.*, 1999). Ras aktiviert den Promotor durch ein CRE/ATF-Element, Rho durch einen parallel verlaufen-

den, bislang unbekannten Signalweg (SLICE *et al.*, 2000). In Makrophagen wird die COX-2 *in vitro* wie auch *in vivo* durch pro-inflammatorische Stimuli heraufreguliert. In diesem Zelltyp kommt es zur Induktion durch Endotoxine wie LPS und zu einer *de novo*-COX-2-mRNA-Synthese. Das LPS-Signal wird dabei über konvergierende Wege über MAPK und PKC weitergeleitet und so in seiner Wirkung amplifiziert. Entscheidende Enhancer-bindende Moleküle sind dabei NF- $\kappa$ B, NF-IL-6 und CRE-Elemente, die unabhängig voneinander wirken, was bei Experimenten mit isolierten Promotor-Konsensus-Plasmiden in der jeweils abgeschwächten Wirkung auf die COX-2 Promotoraktivität z.B. in Gefäßendothelzellen zum Ausdruck kam (INOUE *et al.*, 1990; MESTRE *et al.*, 2001).

### **1.5 Wirkstoffe als Regulatoren des entzündungsrelevanten Enzyms iNOS**

Entsprechend ihrem pharmazeutischen Potential wurden Sekundärmetabolite aus Pilzen seit bereits mehr als 70 Jahren erforscht. Nach der Entdeckung des Penicillins durch Fleming 1929 war der nächste Meilenstein die Entdeckung des Cyclosporins, einem immunsupprimierenden Fermentationsprodukt aus z.B. *Tolypocladium inflatum* (DREYFUSS *et al.*, 1976). Die Wirkstoffe aus Pilzen werden auch Sekundärmetabolite genannt, weil sie keine erkennbare physiologische Funktion für den Pilz haben, sondern aufgrund einer bestimmten überlebenssichernden Funktion von diesem gebildet werden. Sie werden einerseits von ihren Produzenten als Teil einer fortwährenden biochemischen Evolution als Regulatoren verwendet (ZÄHNER & ANKE, 1983) und andererseits kommen sie als Effektoren für die Sporulation und der Differenzierung im Lebenszyklus der Pilze in Frage (BERG *et al.*, 1993). Durch Verarmung des Nährstoffangebotes und durch Änderung der Umweltbedingungen kommt es während der sogenannten Idiophase zu einer Anreicherung von Metaboliten und zur Umstellung auf einen Sekundärstoffwechsel, der im Laufe einer Fermentation zum Beispiel nach dem Verbrauch der Glucose im Medium fortschreitend zunimmt. Dabei werden einzelne Stoffwechselprodukte nicht mehr verwertet, sie häufen sich an und induzieren nachfolgend Enzyme, die diese wiederum zu Sekundärmetaboliten umwandeln. Jene Pilzprodukte können dann entweder in der Hyphe oder im Mycel gespeichert oder auch in das Kulturmedium abgegeben werden. Der Sekundärstoffwechsel wird in der Literatur oft auch als physiologisches Äquivalent der Fruktifikationsphase eingeordnet, da er für Vorgänge verantwortlich gemacht werden kann, die das Charakteristikum des Pilzstammes

ausmachen. Die Wirkung der Sekundärstoffe auf den produzierenden Pilz selber kann bei der Wirkung als Sexualhormon oder auch bei der Sporulationsauslösung eine entscheidende Rolle spielen.

Die Sekundärmetabolite wurden anhand von Charakteristika wie der Färbung, der Giftigkeit und auch einer bestimmten Hemmwirkung isoliert und beschrieben. In der großen heterogenen Gruppe der Sekundärmetabolite sind chemisch sehr unterschiedliche Substanzen vereinigt worden, die teilweise nur eines der Charakteristika für Sekundärstoffe erfüllen.

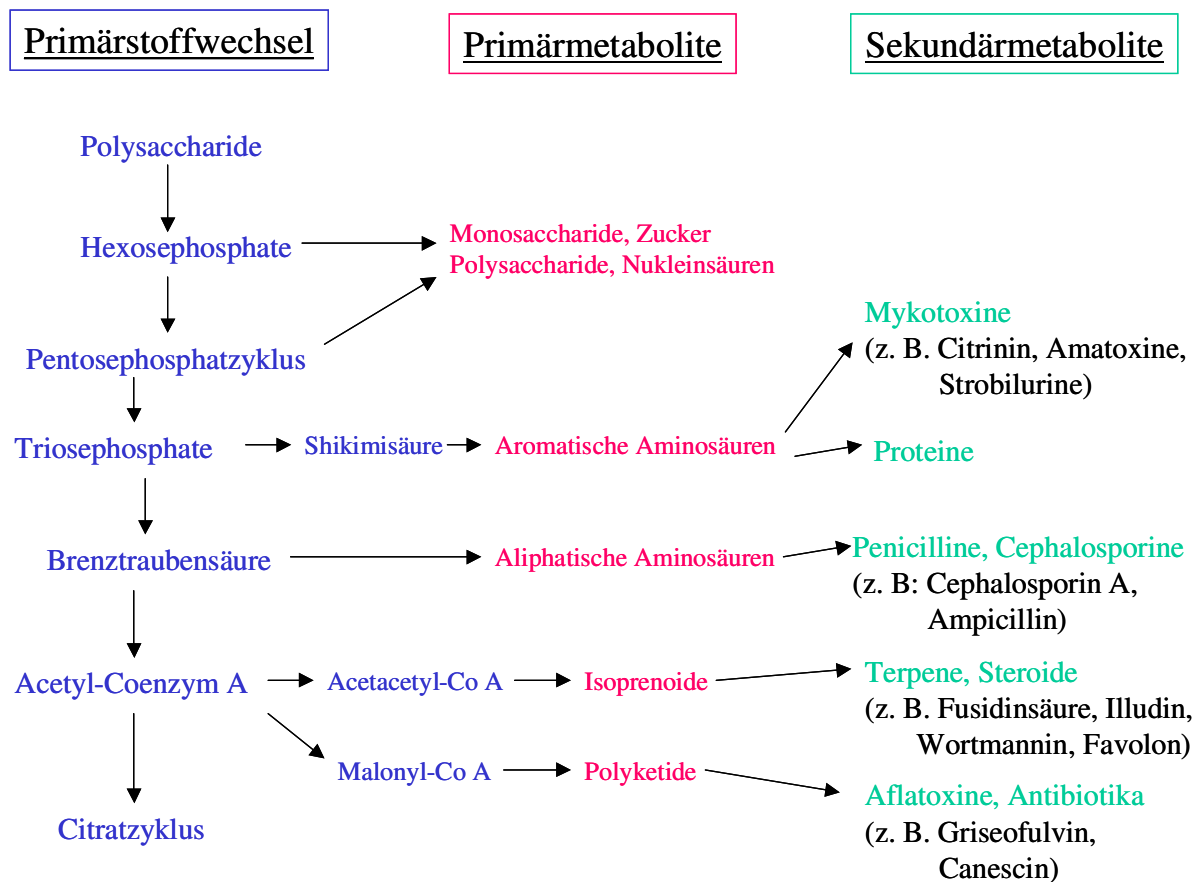


Abbildung 1-3: Zusammenhänge zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel in Pilzen (Schwantes, H.O., 1996).



## **1.6 Untersuchungen zur Funktion kleiner G-Proteine bei der Modulation der iNOS-Expression**

### **1.6.1 Die kleinen G-Proteine**

Im Vergleich mit den heterotrimeren G-Proteinen, die aus drei Untereinheiten bestehen und auch bei vielen rezeptorvermittelten Vorgängen wie z. B. dem Adenylatzyklase-System eine wichtige Rolle spielen, sind die G-Proteine der Klasse der kleinen G-Proteine um ein Vielfaches kleiner. Die kleinen G-Proteine bestehen nur aus einem 20-25 kDa schweren Monomer (EXTON, 1998) und haben eher die Funktion als Übermittler Zellzyklus-spezifischer Signale als die Funktion der Änderung oder Aufrechterhaltung neurophysiologischer Zustände wie die größeren trimeren Verwandten. Die kleinen G-Proteine existieren in zwei Zuständen, die sich durch den Energiestatus der funktionellen Domäne in Form eines Guanosids unterscheidet. Zur Überführung der inaktiven, mit GDP beladenen Form in die aktive, GTP tragende Form ist zunächst die Abspaltung von „verbrauchtem“ GDP erforderlich. Guanin - Nukleotid-Austausch-Faktoren (GEFs), GDP-Dissoziationsstimulatoren (GDSs) und Guanin-Freisetzungs-Proteine (GNRPs) wirken als Freisetzungsfaktoren für GDP und ermöglichen die Bindung von GTP an das aktive Zentrum der G-Proteine. Für die Aktivierung des G-Proteins ist die Abspaltung einer energiereichen Bindung des Nukleotids unter Bildung eines GDP und des energiereichen Phosphatrestes durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) notwendig. Ohne diese ist folglich auch die Herstellung des für die Funktion notwendigen „Grundzustandes“ der G -Proteine (GDP-Bindung) nicht möglich. Allerdings können nur prenylierte, also Isoprenoid-Moleküle tragende, G-Proteine von den GTPase-aktivierenden Proteinen aktiviert werden (MOLNAR *et al.*, 2001). Es wird den GAP's z. B. eine wichtige Rolle beim Umbau des Rac-Moleküls und bei der Translokation von Rac-1 zur Zellmembran zugesprochen. Bei der erblichen Erkrankung Neurofibromatose kommt es zu Mutationen am Locus von NF-1 (Neurofibromatose 1; von Recklinghausen-Krankheit), der dem GAP-Locus annähernd homolog ist, und es kommt zur Unterbrechung des Ras-Signalweges, das bis hin zur Tumorbildungen des Nervensystems führen kann (XU *et al.*, 1990). GDP-Dissoziations-Inhibitoren (GDIs) wurden als Hemmproteine des für die Re-Aktivierung der Proteine notwendigen Nukleotidaustauschs identifiziert (EXTON, 1998). Ein durch die Isoprenoideinheiten verbundener Protein-Dimer bestehend aus Rho-GDI und Rac-GDI ist in

hohem Maße für die Aktivierung der NADPH-Oxidase verantwortlich, der im Zusammenhang mit der Beseitigung von pathogenem Material während der Phagocytose steht (DI-POI *et al.*, 2001).

### **1.6.2 Ras und die kleinen G-Proteine der Rho-Familie**

Die kleinen G-Proteine lassen sich in die 5 Subfamilien Ras, Rho (Ras homology), ARF (ADP-Ribosylation-Factor), Rab (Bovin Ras-related protein) und Ran (Ras-related nuclear protein) einteilen (EXTON, 1998). Ran (Ras-related nuclear protein) fungiert als Faktor bei der ARF und Rab kommt dagegen eine wesentliche Funktion im vesikulären Transport zu, welcher die Grundlage von Sekretions- und Endozytose-Vorgängen bildet. Schließlich spielt Ran eine entscheidende Rolle für den bidirektionalen Transport von Makromolekülen, wie Proteinen oder RNA's, durch die Poren des Zellkerns (MOORE, 1998). Die Rho-Familie kleiner G-Proteine lässt sich wiederum in drei Proteine einteilen, Rho, Rac und Cdc42, die strukturell ähnlich, aber nicht in gleichem Maße durch bestimmte bakterielle Toxine hemmbar sind. Das Proto-Onkogen Ras nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation von Zellproliferation und -differenzierung ein. Kommt es mutationsbedingt zu einem Aminosäureaustausch an der Position 12, 13 oder 61, ist die intrinsische GTPase-Aktivität von Ras nicht mehr durch GAP beeinflussbar. Das infolgedessen nicht mehr zu inaktivierende Ras liefert einen permanenten Wachstumsstimulus. Die Bedeutung dieses Mechanismus lässt sich daran ablesen, dass schätzungsweise 30 % der menschlichen Tumoren eine aktivierende Mutation im Ras-Protein enthalten (VOJTEK & DER, 1998). Die Subfamilien Ras und Rho der Familie der kleinen G-Proteine haben eine große Bedeutung in der expressionellen Regulation, weil sie Bindeglieder zwischen rezeptorgebundenem Cytokin oder Wachstumsfaktor und Weiterleitung des Signals bis zum regulierten Gen darstellen (DENHARDT, 1996; LIM *et al.*, 1996). Der Mechanismus der Signalweiterleitung für das Proto-Onkogen Ras beruht darauf, dass nach der Bindung eines Liganden die Domäne auf der Innenseite des Rezeptors selbst durch Anlagerung eines Phosphatrestes aktiviert oder eine mit dem Rezeptor durch Van-der-Waals-Kräfte assoziierte Protein-Kinase durch Phosphorylierung an einem Serin- oder Threonin-Rest aktiviert wird. Ähnlich den Rho-aktivierenden GAPs wird Ras durch ein Austausch-Protein (Grb2/SOS), welches bei chronischer myelogener Leukämie tumorproliferierend wirkt (KARDINAL *et al.*, 2001), in die aktive Form GTP-Ras überführt. Diese aktive Form des Ras aktiviert die als Raf

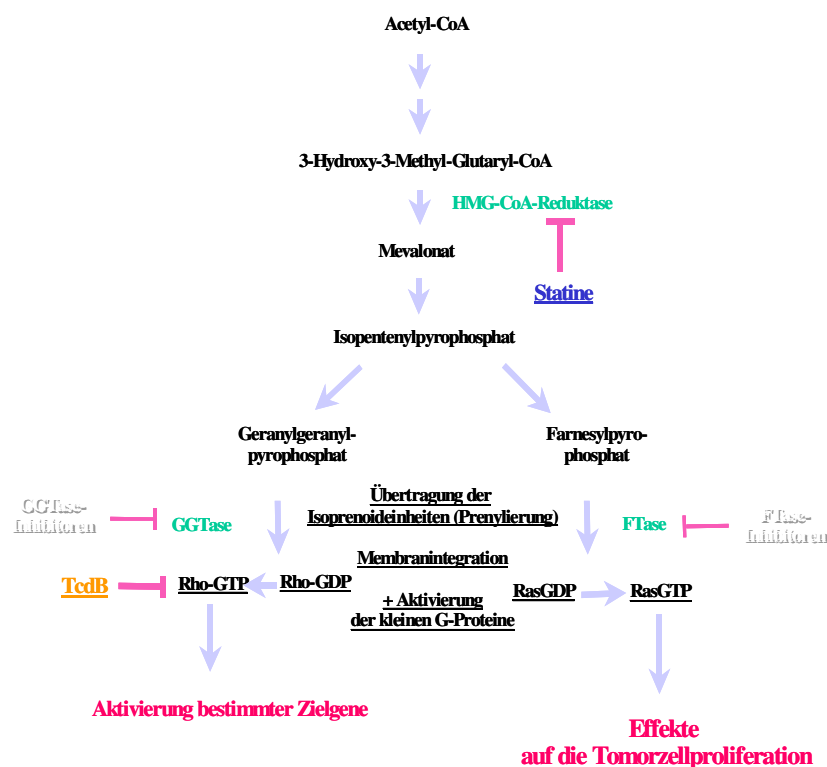
(Ras-activated factor) bezeichnete Proteinkinase (ROWINSKY *et al.*, 1999). Der Transduktionsweg führt nun über MEKKs (MAPKK-Kinase), MEKs (MAPK-Kinase) und Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPKs) und letztlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (DENHARDT, 1996; VOJTEK & DER, 1998). Man unterscheidet 3 verschiedene MAPKs: ERK1/2 (extracellular regulated kinase), JNK (Jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase)/SAPK (stress activated protein kinase) sowie p38MAPK. Die durch GTP-Ras aktivierte Raf-Kinase phosphoryliert zunächst MEK (MAPK/ERK kinase), welche daraufhin ERK phosphoryliert, das zusammen mit STAT-1 IFN- $\gamma$ -abhängige Gene aktiviert (HU *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu bevorzugen die noch weniger gut untersuchten, über Rho-Proteine verlaufenden Signaltransduktionswege die beiden anderen MAPK's JNK/SAPK und p38MAPK (DENHARDT, 1996; LIM *et al.*, 1996; MACKAY & HALL, 1998). JNK/SAPK wird in humanen Zellen vor allem durch Rho-Proteine aktiviert, p38MAPK wird durch MEK's der Transduktionskaskade durch Phosphorylierung aktiviert. SAPK spielen eine gewichtige Rolle apoptotischen Vorgängen in Makrophagen, da sie durch Chinone wie Dihydrocoumarol gehemmt und über sie der NF $\kappa$ B-Weg zur Apoptoseauslösung inhibiert wird (CROSS *et al.*, 1999). Auf der Suche nach direkt an GTP-Rho (GTP-Rac, -Cdc42 und -Rho) bindenden Proteinkinasen, ist für GTP-Rac und -Cdc42 unter anderem die PAK (p21-activated kinase) und für GTP-Rho unter anderem die p160 Rho-A-Kinase gefunden worden (LIM *et al.*, 1996; MACKAY & HALL, 1998). Bestimmte Signalwege beeinflussende, natürlich vorkommende Verbindungen als Hemmstoffe verschiedener Kinasen tragen zur Klärung der Zusammenhänge Entscheidendes bei.

Die Translokation der Signalmoleküle an ihren Wirkort und auch die Verankerung an der Membrannenseite ist Voraussetzung für die Funktion und die Aktivierung z. B auch der kleinen G-Proteine. Isoprenoideinheiten unterschiedlicher Länge tragen neben stabilisierenden Faktoren entscheidend zur Verankerung der G-Proteine bei und sichern durch eine bestimmte Konformationsstabilisierung die Funktion dieser Moleküle. Die Aktivierung durch Prenylierung erfolgt zumeist über lipophile Farnesyl- oder Geranylgeranylreste (GIBBS & OLIFF, 1997). Abhängig von der Bereitstellung unterschiedlicher Isoprenoideinheiten zur posttranslationalen Farnesylierung bzw. Geranylgeranylierung kommt es bei Mangel an Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) zu einer Einschränkung der Funktion von Ras- oder Rho-Proteinen. Farnesyltransferase- bzw. Geranylgeranyltransferase-Inhibitoren können durch Verhinderung der Prenylierung die Aktivierung der G-Proteine wirksam unter-

binden (LERNER *et al.*, 1995). Vor dem Hintergrund, daß mehr als 30 % der humanen Tumoren ein mutiertes, nicht mehr zu inaktivierendes Ras aufweisen (VOJTEK & DER, 1998; ROWINSKY *et al.*, 1999), liegen darüber hinaus in der Anwendung von Farnesyltransferaseinhibitoren neue therapeutische Möglichkeiten in der Tumorthherapie (GIBBS & OLIFF, 1997; BREDEL *et al.*, 1998). Da Statine zu einer Verringerung des Produktes der HMG-CoA-Reduktase-Reaktion, des Mevalonats, führen, kommt es zu einer Depletierung der für die Aktivierung der Ras/Rho-Proteine essentiellen Isoprenoideinheiten. Lovastatin (s. u.) induziert bei Ratten-Neuroblastom-Zellen über Hemmung der Prenylierung von Ras und RhoA indirekt die zelluläre Apoptose, die sich in einem Anstieg der Bcl-2-Proteinmenge manifestierte (GARCIA-ROMAN *et al.*, 2001). Es zeigte sich weiterhin, dass Ras-Proteine vorwiegend farnesyliert und Rho-Proteine hauptsächlich geranylgeranyliert werden (DENHARDT, 1996). Wege, die Wirkung der G-Proteine einzuschränken, bilden einerseits die Hemmung des Schlüsselenzyms der Cholesterinbiosynthese (HMG-CoA-Reduktase) und andererseits die direkte Inaktivierung der Rho-Proteine durch Glucosylierung mittels bakterieller Toxine (Toxin B). Verbindungen wie Lovastatin und Atorvastatin aus der Klasse der Statine, die als Lipidsenker bekannt sind, sind in der Lage, das Zwischenprodukt Mevalonat so weit in der Zelle zu verringern, dass die Folgeprodukte, die Isoprenoideinheiten, nicht mehr für eine Aktivierung der kleinen G-Proteine zur Verfügung stehen.

G-Proteine der Rho-Subfamilie haben eine wichtige Funktion bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts über eine *de novo*-Polymerisation von filamentösem (F-)Aktin aus globulärem (G)-Aktin sowie eine Quervernetzung von F-Aktin. Damit geht die Regulation Aktin-Zytoskelett-abhängiger Zellfunktionen einher, wie z.B. Zellmotilität, Zytokinese, Zellmorphologie, Zellpolarität und interzelluläre Kontakte (MACKAY & HALL, 1998). Neben der Verhinderung der für die Funktion notwendigen Membranverankerung der kleinen G-Proteine als Angriffspunkt für die Funktionsanalyse dieser Transduktoren bietet sich durch bakterielle Toxine die Möglichkeit, die Aktivität von Rho-Proteinen direkt beeinflussen.

Das in dieser Arbeit verwendete Toxin B aus *Clostridium difficile*, das im menschlichen Organismus für die Antibiotika-assoziierte Diarrhoe (Pseudomembranöse Colitis) verantwortlich gemacht wird, ist eine Glucosyltransferase. Es führt unter Verwendung des Substrats UDP-Glucose zur Glucosylierung der Rho-Proteine (Rho, Rac und Cdc42) und zur Deaktivierung, die Aktivität der Ras-Proteine wird dagegen nicht beeinflusst. Das relativ hohe Molekulargewicht der Toxine von 270 kDa scheint eine direkte Aufnahme des Glykopro-



**Abbildung 1-4: Der Mevalonat-Weg** innerhalb der Cholesterin-Biosynthese und dessen Inhibition durch Statine und Toxin B aus *Clostridium difficile*.

GGTase: Geranylgeranyl-Transferase; FTase: Farnesyl-Transferase; TcdB: Toxin B aus *Clostridium difficile*.

teins in die Zelle unmöglich zu machen, was eine Rezeptor-vermittelte Endocytose vermuten lässt (EICHEL-STREIBER, v. *et al.*, 1996).

In Ratten-Zellen sind bereits einige Untersuchungen zur Beteiligung von Ras und Rho in der iNOS-Expression durchgeführt worden. PAHAN *et al.* beschrieben für Lovastatin einen inhibitorischen Effekt auf die LPS-induzierte iNOS-Expression in primären Ratten-Astrozyten, der durch Mevalonat und Farnesylpyrophosphat wieder aufgehoben werden konnte (PAHAN *et al.*, 1997). Da die Farnesylierung für die Aktivierbarkeit von Ras-Proteinen Voraussetzung ist (GIBBS & OLIFF, 1997), schlossen die Autoren, dass in diesen Zellen die iNOS-Induktion von der Aktivierung von Ras-Proteinen abhängt.

Demgegenüber beobachteten FINDER *et al.* in glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien sowie in Hepatozyten der Ratte in Gegenwart von Lovastatin oder einem spezifischen Inhibitor der Geranylgeranyltransferase I eine Super-Induktion der IL-1 $\beta$ -induzierten iNOS-Expression. Andererseits resultierte aus der Blockade der Protein-Farnesylierung mittels eines spezifischen Farnesyltransferase-Inhibitors eine verminderte iNOS-Induktion in diesen Zellen. (FINDER *et al.*, 1997). Es scheint somit, dass in den von Finder *et al.* untersuchten Zellen die geranylgeranylierten Rho-Proteine die iNOS-Expression hemmen, während die farnesylierten Ras-Proteine für die iNOS-Induktion erforderlich sind.

## 2 Material

### 2.1 Allgemeine Materialien

Die nachfolgend aufgeführten Materialien und Geräte wurden für die Analysen der Regulation der Genexpression verwendet. Auf Material und Methodik zur Herstellung reiner Fermentationsprodukte sowie der Einstellung von Lösungen synthetisch hergestellter regulativer Substanzen wird im Abschnitt 2.2 näher eingegangen. Die Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert vermerkt, in p.A.-Qualität verwendet.

#### 2.1.1 Laborgeräte

- |   |  |
|---|--|
| ▪ Tischzentrifugen  | Biofuge 13, Heraeus und<br>Centrifuge 5417C, (Eppendorf)           |
| ▪ Kühlzentrifugen   | Biofuge <i>fresco</i> , Heraeus und<br>Megafuge 1.0 R, Heraeus     |
| ▪ Vakuumzentrifuge  | Speed Vac SC-110 mit Kühlfalle Vapor Trap<br>RVT 100 (Savant)      |
| ▪ Gelelektrophorese-Kammer für RNase-<br>Verdauungsschutz-Analyse | MBT50EI für RNA, (Labotec)   |
| ▪ Gelrockner  | Modell 583 und 543 Gel Dryer mit Kühlfalle,<br>Bio-Rad             |
| ▪ Luminometer   | Lumat LB 9501, Berthold  |
| ▪ Photometer  | Uvikon 941 Spectrophotometer, Kontron und<br>Gene Quant, Pharmacia |
| ▪ ELISA-Reader  | EL 340 Automated Microplate Reader, Biotec                         |
| ▪ Szintillationszähler  | Tri-Carb 460 CD und<br>Cobra QC, Packard                           |
| ▪ Molecular Imager  | GS-250 Phosphor Imaging System, Bio-<br>Rad                        |

- pH-Meter φ 32 pH-Meter, Beckman
- Brutschrank Gas-Inkubator, Heraeus

## 2.1.2 Chemikalien

### 2.1.2.1 Lösungsmittel für molekularbiologische Methoden in p.A.-Qualität

- Ethanol Riedel de Haen, Seelze
- 2-Propanol (Isopropanol) Fluka, Braunschweig

### 2.1.2.2 Spezielle Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma, Merck und Roth in p.A.-Qualität bezogen.

- Acrylamidlösung (gebrauchsfertige, wässrige 38%ige Lösung, die 2 % Bisacrylamid enthielt (19:1)) Applchem, Darmstadt
- Agarose Sigma, Deisenhofen
- Ammoniumperoxodisulfat (APS) Sigma, Deisenhofen
- Antibiotikum G418-Sulfat, G418 Calbiochem, Bad Homburg/Ts.
- ATP Applchem, Darmstadt
- Bradford-Lösung 40 % Bio-Rad, München
- Bromphenolblau Sigma, Deisenhofen
- Bovines Serumalbumin (BSA) Sigma, Deisenhofen
- Coelenterazin Biotrend, Köln
- Coenzym A Applchem, Darmstadt
- Diethylpyrocarbonat (DEPC) Sigma, Deisenhofen

▪ Dimethylchlorosilan	Sigma, Deisenhofen
▪ Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
▪ D-Luciferin	Appllichem, Darmstadt
▪ N, N, N', N' -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
▪ Naphthylethyldiamin (NEDA)	Sigma, Deisenhofen
▪ Natriumnitrit (NaNO <sub>2</sub> )	Sigma, Deisenhofen
▪ NTP's und dNTP's	Pharmacia, Giessen
▪ PBS (Phosphate-Buffered Saline)	Apotheke des Klinikums der Johannes Gutenberg-Universität
▪ Passive-Lysis-Buffer (5x)	Promega, Mannheim
▪ Piperazin-1,4-(2-Ethansulfonsäure) (PIPES)	Roth, Karlsruhe
▪ Polyethylenimin (hochmolekular, >25.000, wasserfrei)	Sigma, Deisenhofen
▪ Polymyxin B Sulfat	Appllichem, Darmstadt
▪ RNase-Inhibitor (40 U/μl)	Pharmacia, Gießen
▪ Sulfanilamid	Sigma, Deisenhofen
▪ Szintillationsflüssigkeit Quicksafe A	Zinnsser Analytik, Frankfurt
▪ Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

### 2.1.2.3 Radiochemikalien

Die verwendeten Radionukleotide wurden von der Firma ICN bezogen und wurden bei 4°C gelagert.



- $\alpha$ -P<sup>32</sup>-UTP wurde bei *in vitro*-Transkriptionen zur Herstellung der Sonden, die in der RNase-Verdauungsschutzanalyse eingesetzt wurden, verwendet.  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP kam bei der Markierung des Molekulargewichts-Markers der RNase-Verdauungsschutzanalyse und bei Oligonukleotid-Markierungen für die Gelretentionsanalyse zur Anwendung.

Die Zelllinien wurden ursprünglich von der ATCC (American Tissue Culture Collection) bezogen und für die Experimente mit einer Passagenzahl von bis ca. 40 genutzt. Auf die anderen verwendeten Zelllinien DLD1 und ECVpGl<sub>3</sub>ecNOS(3.5)P1Luc wird in den Abschnitten 2.2 bzw. 2.3 betreffend die Experimente im Teil „iNOS-inhibierende Wirkstoffe“ bzw. „Rho-Proteine und iNOS-Expression“ näher eingegangen.

**Tabelle 2-1 : Allgemein verwendete Zelllinien.** Zelllinien und ihre Herkunft aus humanen Gewebe oder durch stabile Transfektion mit einem Reporter-Plasmid veränderte Zelllinien, die in Induktions-Versuchen und sich anschließenden iNOS-Expressions-Analysen ihre Anwendung fanden.

## 2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen für die Zellkultur

Außer den SDS-haltigen Lösungen wurden sämtliche Lösungen und Puffer autoklaviert und die Medien sterilfiltriert. Alle Medien, Medienzusätze und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma bezogen.

### Medienzusätze:

Fötales Kälberserum (fetal calf serum, FCS), hitzeinaktiviert, (PAA)

L-Glutamin (100x konzentriert, 200 mM)

Pyruvat (100x konzentriert, 100 mM)

Penicillin/Streptomycin (100x konzentriert, 10.000 U bzw. 10 mg/ml)

Polymyxin B Sulfat (4000x konzentriert, 10 mg/ml bei 7000 U/mg)

### Als gebrauchsfertige Lösungen wurden verwendet:

Steriles PBS (Apotheke der Universitätsklinik Mainz)

Trypsin/EDTA-Lösung (10x konzentriert, 2,5 %, Verdünnung mit PBS)

### 2.1.4.1 Medien für Zellkultur

Die Zelllinien wurden alle in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert, welches mit foetalem Kälberserum versetzt wurde. DMEM wurde von Sigma mit 4,5 g/l Glucose mit Phenolrot bezogen. Dem Medium wurden Pyruvat (100x konzentriert) und Penicillin/Streptomycin (100x konzentriert) im Verhältnis zum Medium 1:100 zugesetzt.

Kultivierte Zelllinie	FCS-Gehalt des Mediums	G-418-Gehalt des Mediums (DMEM)
▪ <u>A549/8</u>	5 %	-----
▪ <u>A549/8pNOS2(16)Luc</u>	5 %	0,5 mg/ml

***Tabelle 2-2: Medienzusätze für die allgemein verwendeten Zelllinien.***

G-418 wurde den Selektionsmedien für stabil mit Reportergenkonstrukten transfizierten Zelllinien in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugesetzt. Auf die speziell verwendeten Zelllinien in dem entsprechenden Material-Teil 2.2 eingegangen. Als Medium zur iNOS-Induktion wurde DMEM ohne FCS und Phenolrot und mit 1 g/l Glucose und 1x konzentriertem Pyruvat und 8 mM Glutamin verwendet. Diesem Medium wurden die untersuchten Substanzen zugesetzt, die vorher in ethanolischer Lösung bzw. in Dimethylsulfoxid 1000 x konzentriert vorgelöst wurden. Durch Verwendung des Mangelmediums sollte eine stabile Induktionsrate durch die später nach Mediumwechsel zugegebenen Cytokine erreicht werden.

#### 2.1.4.2 Cytokine für die Zellinduktion

Die Cytokin-Stammlösungen wurden mit 1 %-BSA-haltigem, sterilen PBS angesetzt, aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Cytokin	Exprimiert in ..	Hersteller	Konzentration der Stammlösung
▪ humanes rekombinantes IFN- $\gamma$	E. coli	Strathmann Biotech GmbH	$10^6$ U/ml
▪ humanes rekombinantes IL-1 $\beta$	E. coli	Strathmann Biotech GmbH	$2 \times 10^6$ U/ml
▪ humanes rekombinantes TNF- $\alpha$	E. coli	Strathmann Biotech GmbH	$10^6$ U (50 $\mu$ g)/ml

*Tabelle 2-3: Cytokine zur Induktion der iNOS und ihre Herkunft.*

Eingesetzt wurden die Cytokine in Verdünnungen, die in Tabelle 2-4 angegeben sind.

Cytokin	Stammlösung (in 1 % BSA in PBS)	Gebrauchslösung (in Medium)
▪ humanes rekombinantes IFN- $\gamma$	1000 U/ $\mu$ l	100 U/ml
▪ humanes rekombinantes IL-1 $\beta$	2000 U/ $\mu$ l	100 U/ml
▪ humanes rekombinantes TNF- $\alpha$	50 ng/ $\mu$ l	10 ng/ml

*Tabelle 2-4: Zum Zwecke der Induktion von iNOS verwendete Cytokin-Konzentrationen.*

## 2.1.5 Lösungen und Puffer für den allgemeinen Laborgebrauch

Die folgenden Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht gesondert erwähnt, mit bidestilliertem Wasser angesetzt, wobei die Puffer, die zur Verwendung für RNA benutzt wurden, mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt und nachfolgend autoklaviert wurden.

### 2.1.5.1 Lösungen und Puffer für DNA-Präparationen

- TE-Puffer 10 mM Tris-HCl pH 8.0  
1 mM EDTA
- Maniatis I-Lösung (SET-Puffer) 50 mM Glucose  
25 mM TrisHCl pH 8.0  
10 mM EDTA pH 8.0
- Maniatis II-Lösung 0,2 N NaOH  
1 % SDS
- Maniatis III-Lösung 3 M Kalium-Acetat pH 4.6
- Molekulargewichtsmarker I pcDNA x Hinf I (83 – 1058 bp)
- Molekulargewichtsmarker II  $\phi$ 174 x Hinf I (0,12 – 20,1 kb) (Ambion)

- Phenol, Tris-Base-gesättigt (NaOH)      Phenol in 1 Liter 1M Tris-Base pH 8.0 bei 50°C gelöst und Einstellen der Phenol-Lösung mit pH Papier und 0.5 M Tris-Base bis pH 8.0 erreicht ist.
- Phenol/Chloroform-Lösung                      Gemisch von Phenol Tris-Base pH 8.0 und Chloroform im Verhältnis 1:1

#### **2.1.5.2 Lösungen und Puffer für RNA-Präparationen**

- DEPC-Wasser                                      200 µl DEPC in 1 l Wasser
- GIT-Puffer    4 M Guanidiniumisothiocyanat  
25 mM Natriumcitrat pH 7.0  
0,5 % Lauroylsarcosin  
0,1 M 2-Mercaptoethanol
- Phenol, wassergesättigt                      Phenol pH 4.0, abgesättigt in 2 Volumen DEPC-Wasser
- 2 M Natriumacetat-Lösung                      2 M Natriumacetat pH 4.0
- Chloroform, Isoamylalkohol-gesättigt      24 Teile Chloroform p. A. gemischt mit 1 Teil Isoamylalkohol

#### **2.1.5.3 Puffer und Lösungen für die RNase-Verdauungsschutzanalyse**

- AL-Puffer (2x)                                      2 M Ammoniumacetat  
0,2 % Lauroylsarcosin
- Transkriptionspuffer (10x)                      400 mM Tris-HCl pH 7.5  
100 mM NaCl  
60 mM MgCl<sub>2</sub>  
20 mM Spermidin

- RNA/RNA-Hybridisierungspuffer      400 mM NaCl  
40 mM PIPES pH 6.7  
1 mM EDTA  
50 % Formamid, entionisiert
- RNase A/T1-Verdauungs-Puffer      300 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl pH 7.5  
5 mM EDTA
- Proteinase K-Puffer      10 mM Tris-HCl pH 7.4  
10 mM EDTA
- Phenol-Chloroform (pH 8.0)      Gemisch von Phenol (Tris-gesättigt; pH 8.0) und  
Chloroform (1:1)
- Formamid-Proben-Puffer (FAPP)      80 % Formamid, entionisiert  
0,1 % SDS  
10 mM EDTA  
1 mg/ml Bromphenolblau  
1 mg/ml Xylencyanol
- 6 %-iges denaturierendes Acrylamidgel      12 g Harnstoff  
2,5 ml 10 x TBE-Puffer  
4 ml 40 %ige Acrylamidlösung  
ad 25 ml *Aqua bidest.*  
Zur Polymerisierung wurden der Gel-Lösung 20µl  
TEMED und 200 µl frische 10-%ige APS-Lösung  
zugeetzt.
- Fixierlösung      10 % Essigsäure  
10 % Methanol p.A.  
80 % Wasser
- Repell-Silan      200 µl Dimethyldichlorsilan in 5 ml Chloroform

#### 2.1.5.4 Puffer und Lösungen für die Griess-Analyse

- Sulfanilamid (SA)-Lösung                      12,5 mM in *Aqua bidest.*,  
10 min Ultraschall zur Lösung der Festsubstanz
- Naphthylethyldiamin (NEDA)-  
Lösung    12,5 mM in *Aqua bidest.*
- Natriumnitrit (NaNO<sub>2</sub>)-Lösung              100 µM in *Aqua bidest.*

#### 2.1.5.5 Puffer und Lösungen für die Reportergen-Analyse

- Luziferase-Puffer (2x)                      60 mM Tricine pH 7.8  
0.2 mM EDTA  
30 mM MgSO<sub>4</sub>  
20 mM DTT
- Luziferase-Substrat-Lösung                  25 mM D-Luziferin, gelöst in 25 mM NaOH  
  
27 µM Coenzym A, gelöst in Wasser  
100 mM ATP, gelöst in 0,2 M Tris-Base
- Renilla-Puffer                                  0.1 M NaCl  
25 mM Tris-HCl pH 7.5  
1 mM CaCl<sub>2</sub>
- Renilla-Substrat-Lösung                      50 mM Coelenterazin in Renilla-Puffer

## 2.1.6 Plasmide

Die aufgeführten Plasmide wurden von der Arbeitsgruppe um PD Dr. Hartmut Kleinert und der Arbeitsgruppe um PD Dr. G. Erkel zur Verfügung gestellt.

### 2.1.6.1 Plasmide zur Verwendung als Reportergen-Vektoren (Transfektion humaner Zelllinien / Luziferase-Assay)

Name	Beschreibung	Hersteller	Literatur
pNOS2(16)Luc	Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle eines 16 kb-Fragments des humanen iNOS-Promotors  (16 kb des humanen iNOS-Promotors in pXP2)	GELLER (Department of Surgery, University of Pittsburgh, USA)	DE VERA <i>et al.</i> , 1996
pGl <sub>3</sub> COX2(1.4) Luc	Luziferase-Reportergen unter der Kontrolle eines 1.4 kb-Fragments des humanen COX-2-Promotors	ERKEL, 2001	MUTOH <i>et al.</i> , 2000; SILBERBORTH <i>et al.</i> , 2001
pRc-CMV (AF 025843)	eukaryoter Expressionsvektor, der Neomycin/G418-Resistenzgen enthält	Invitrogen	

**Tabelle 2-5 : Plasmid-DNA für die Transfektion humaner Zelllinien.**

Die ebenso in humane A549/8-Zellen transfizierten Plasmide, die Abschnitte des ecNOS- bzw. des TNF- $\alpha$ -Promotors enthalten, werden im Abschnitt 2.2 besprochen, da diese nur im Wirkstoff-Teil verwendet wurden.



### 2.1.6.2 Plasmide zur Verwendung als Matrizen für die *in vitro*-Transkription (RNase-Verdauungsschutzanalyse)

Name der Sonden-DNA	Beschreibung	Hersteller
pCR-INDNO5A3A-Human del Sma	pCRScript mit einem 382 bp-cDNA-Fragment der humanen iNOS (Position 3472-3853; GELLER <i>et al.</i> , 1993)  (pCR-INDNO5A3A-Human mit <i>Sma</i> I restringiert und Vektor religiert)	KLEINERT  (Pharmakologisches Institut der Universität Mainz)
pXcm-huNOS2-5P/3P	pXcmI mit einem humanspezifischen 315 bp-cDNA-Fragment der humanen iNOS (Position 230-544; GELLER <i>et al.</i> , 1993)	KLEINERT  (Pharmakol. Institut der Universität Mainz)
pCR-luc-pGL2	pCRScript mit einem 230 bp-cDNA-Fragment der Luziferase (Position 306-535; mittels <i>Hinf</i> I aus pGL <sub>2</sub> -Basic herausgeschnitten)	RODRIGUEZ-PASQUAL (CIB-CSIC, Madrid, Spanien)
pCR-iNOS-mouse	pCRScript mit einem 184 bp-cDNA-Fragment der murinen iNOS (mit <i>Nco</i> I restringiert und mit Vektor religiert)	KLEINERT  (Pharmakol. Institut der Universität Mainz)

Name der Bezugs-Sonden-DNA	Beschreibung	Hersteller
pKS-human- $\beta$ Aktin-Eco/Nar	pKS mit einem 108 bp-cDNA-Fragment des humanen $\beta$ -Aktins (Position 516-623; PONTE <i>et al.</i> , 1984)	RODRIGUEZ-PASQUAL (CIB-CSIC, Madrid, Spanien)
phGAPDH 105	pXcmI mit einem 105 bp-cDNA-Fragment der humanen GAPDH (Position 486-590; TUKUNAGA <i>et al.</i> , 1987)	BOISSEL (Pharmakol. Institut der Universität Mainz)
pCR- $\beta$ -Actin-mouse	pCR mit einem 108 bp-cDNA-Fragment des murinen $\beta$ -Aktins	KLEINERT  (Pharmakol. Institut der Universität Mainz)

**Tabelle 2-6 : Plasmid-DNA-Spezies für die RNA-Sonden-Herstellung.**

### 2.1.6.3 Original-Plasmide zur Herstellung der DNA-Konstrukte

Name	Beschreibung	Hersteller/Literatur
pXP2 (AF 093682)	Luziferase-Reportergen ohne Promotor	NORDEEN, 1988
pCR-INDNO5A3A-Human	pCRScript mit einem 726 bp-cDNA-Fragment der humanen iNOS (Position 3128-3853; Geller, D. A. <i>et al.</i> , 1993)	KLEINERT (Pharmakologisches Institut der Universität Mainz)
pCRScript (U 46017)	Plasmid zum Klonieren von PCR-Fragmenten, MCS flankiert von einem T7- und einem T3-Promotor	Stratagene
pXcmI	modifiziertes pCRScript, das für ein besseres Klonieren von PCR-Fragmenten in der MCS zwei XcmI-Schnittstellen enthält	BOROVKOV & RIVKIN, 1997
pGL2-Basic (X 65323)	Luziferase-Reportergen ohne Promotor	Promega
pGL3-neo	Luziferase-Reportergen ohne Promotor	Promega
pKS (L 08784)	Plasmid zum Klonieren von PCR-Fragmenten, MCS flankiert von einem T7- und einem T3-Promotor	Stratagene

**Tabelle 2-7 : Ursprüngliche Plasmid-DNA-Spezies für die Herstellung der Konstrukte.**

### 2.1.7 Enzyme

Enzym	Herkunft	Beschreibung
<i>T3 RNA-Polymerase</i> , 10 U/μl	Boehringer Mannheim	DNA-abhängige RNA-Polymerase, spezifisch für den T3-Promotor
<i>T7 RNA-Polymerase</i> 10 U/μl	Boehringer Mannheim	DNA-abhängige RNA-Polymerase, spezifisch für den T7-Promotor
<i>DNase I</i> , RNase-frei, 10 U/μl	Boehringer Mannheim	Doppelstrang-spezifische Endonuklease
<i>RNase A</i> , 10 U/μl	Sigma	pyrimidin-spezifische Endonuklease, welche die einzelsträngige RNA verdaut
<i>RNase T1</i> , 100 U/μl	Boehringer Mannheim	verdaut einzelsträngige RNA vom 3'-Ende bis zum ersten G
<i>Proteinase K</i> (EC 3.4.21.14)	Boehringer Mannheim	gewonnen aus <i>Tritirachium album</i>
<i>Alkalische Phosphatase</i>	Tropix	PhosphaLight Detection Kit
<i>Trypsin</i> , 2,5%ige Lösung (EC 3.4.21.4)	Boehringer Mannheim	gewonnen aus Schweine-Pankreas
<i>Eco 47 III = Afe I</i>	New England Biolab (NEB)	Restriktionsendonuklease, spezifische Erkennungssequenz: AGC↓GCT
<i>Not I</i>	New England Biolab (NEB)	Restriktionsendonuklease, spezifische Erkennungssequenz: GC↓GGCCGC
<i>Bam HI</i>	New England Biolab (NEB)	Restriktionsendonuklease, spezifische Erkennungssequenz: G↓GATCC
<i>Xho I</i>	New England Biolab (NEB)	Restriktionsendonuklease, spezifische Erkennungssequenz: C↓TCGAG
<i>Eco RI</i>	Pharmacia	Restriktionsendonuklease, spezifische Erkennungssequenz: G↓AATTC
<i>Hind III</i>	Pharmacia	Restriktionsendonuklease, spezifische Erkennungssequenz: A↓AGCTT

**Tabelle 2-8 : Verwendete Enzyme für die RNase-Verdauungsschutzanalyse, Zellkultur für die SEAP-Reportergen-Analyse und Restriktionsanalysen.**

### 2.1.8 **Kits**

- DOTAP (Transfektionsreagenz für kationische Liposomen-vermittelte Transfektion der DNA in eukaryotische Zellen) Boehringer, Mannheim
- Primer-Extension-Kit (Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Markers für die RNase- Schutzanalyse) Promega, Mannheim
- Phospha-Light-AP-Detection-Kit Tropix, U.S.A

### 2.1.9 **Sonstige Materialien**

- Whatman 3 MM Papier 3469, (Schleicher und Schuell)
- Photomaterialien Entwickler- und Fixierer-Lösung, (Kodak)  
Röntgenfilme, (Agfa)  
Röntgenfilm-Fluoreszenzschirme (Agfa)

## 2.2 **Spezielles Material für die „Isolierung von Wirkstoffen aus Pilzen mit Wirkung auf die Expression entzündungsrelevanter Enzyme“**

Für die Arbeiten zur Isolierung von Wirkstoffen wurden spezielle Chemikalien und Gerätschaften eingesetzt, die ausschließlich dafür verwendet wurden.

### 2.2.1 **Gerätschaft für die Durchführung von Pilzfermentationen und deren Analyse**

- Filterpresse Niro 200 Schenk, Waldstetten
- Prozessleitsystem Mikro-MFCS Braun, Melsungen
- Sauerstoffelektrode (Typ O2-Sensor, 25mm Durchm.) Fa. Ingold, Köln

- O<sub>2</sub>-Abgasanalytik-Element (Magnetopneumatischer O<sub>2</sub>-Analysator Typ Magnos 4G) Fa. Hartmann & Braun, Frankfurt
- CO<sub>2</sub>-Abgasanalytik-Element (CO<sub>2</sub>-Analysator Uras 10P) Fa. Hartmann & Braun, Frankfurt
- HPLC-Säule analytische HPLC-RP-18 (HP 1090 Series II) Hewlett-Packard, Waldbronn
- LSC-Gerät (Betasint BF 5001, Wallace 1410) Pharmacia, Freiburg
- Quadrupol-Massenspektrometer (HP 1100 MSD) Hewlett-Packard, Waldbronn
- RP18-Säule (LiChrospher, 5 µm, 125 x 4 mm) Merck, Darmstadt

### 2.2.2 Chemikalien zur Analyse der Fermentationsprodukte

Als Lösungsmittel für die HPLC-Analysen wurden folgende Chemikalien in ultrareiner Qualität verwendet:

- Acetonitril Scharlau Chemie, Barcelona (Spanien)
- Cyclohexan Scharlau Chemie, Barcelona (Spanien)
- *tert*-Butylmethylether Scharlau Chemie, Barcelona (Spanien)
- Essigsäureethylester Scharlau Chemie, Barcelona (Spanien)

Als Lösungsmittel in „Reinst“-Qualität wurden folgende Chemikalien verwendet :

- Aceton Baker, Deventer (Niederlande)
- Acetonitril Scharlau Chemie, Barcelona (Spanien)
- Cyclohexan Merck, Darmstadt

- |                                 |                        |
|---------------------------------|------------------------|
| ▪ Methanol                      | Merck, Darmstadt       |
| ▪ <i>tert</i> -Butylmethylether | Merck, Darmstadt       |
| ▪ Essigsäureethylester          | Merck, Darmstadt       |
| ▪ Toluol                        | Riedel de Haen, Seelze |
| ▪ 2-Propanol                    | Riedel de Haen, Seelze |

Folgende spezielle Chemikalien wurden im Wirkstoff-Teil verwendet:

- |  |                                |
|--|--------------------------------|
| ▪ Adsorberharz DIAION HP 21                      | Mitsubishi, Düsseldorf         |
| ▪ $\alpha$ -Glucosidase                          | Roche Boehringer, Mannheim     |
| ▪ Diabur-Test 5000, Glucose-Teststreifen         | Roche Boehringer, Mannheim     |
| ▪ Spanagar                                       | H. Carroux, Hamburg            |
| ▪ Glucose, („Dextropur“)                         | Deutsche Maizenawerke, Hamburg |
| ▪ Malzextrakt                                    | Dr. Fränkle und Eck, Fellbach  |
| ▪ Hexokinase                                     | Roche Boehringer, Mannheim     |
| ▪ Hefeextrakt                                    | Hans Hartge GmbH, Hamburg      |
| ▪ Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                | Merck, Darmstadt               |
| ▪ NADP-Dinatriumsalz                             | Roche Boehringer, Mannheim     |
| ▪ Ionomycin                                      | Sigma, Deisenhofen             |
| ▪ TPA  | Sigma, Deisenhofen             |
| ▪ Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>                | Sigma, Deisenhofen             |
| ▪ (1- <sup>14</sup> C)-Leucin (50-60 mCi/mmol)   | NEN Du Pont, Bad Homburg       |
| ▪ (2- <sup>14</sup> C)-Uridin (50-60 mCi/mmol)   | NEN Du Pont, Bad Homburg       |
| ▪ (2- <sup>14</sup> C)-Thymidin (50-60 mCi/mmol) | NEN Du Pont, Bad Homburg       |
| ▪ Silikon-Entschäumer                            | Merck, Darmstadt               |

- |  |                        |
|--|------------------------|
| ▪ Trichloressigsäure                         | Sigma, Deisenhofen     |
| ▪ Vanillin                                   | Merck, Darmstadt       |
| ▪ Salzsäure (32 %, p. A.)                    | Riedel de Haen, Seelze |
| ▪ Wasserfreier Szintillator (Quickszint 501) | Pharmacia, Freiburg    |
| ▪ Poly (dI-dC)                               | Pharmacia, Freiburg    |
| ▪ Kieselgel 60, 0.025-0.040 mm; 0.063-0.2 mm | Merck, Darmstadt       |

### **2.2.3 Oligonukleotide für die Gelretentionsanalyse**

Das Oligonukleotid für die STAT-1 $\alpha$ -Gelretentionsanalyse wurde bereits als ds-DNA geliefert, sodass es gebrauchsfertig war und nur noch eine passende Verdünnung (100  $\mu$ g/ $\mu$ l) hergestellt wurde.

Oligonukleotid für STAT-1 $\alpha$ :

Konsensus-Nukleotid, 5'-CAT GTT ATG CAT ATT CCT GTA AGT G-3' (Santa Cruz)

### **2.2.4 Kits zur Fermentationsverlaufsanalyse und für die Ermittlung der Zytotoxizität**

- |   |                       |
|---|-----------------------|
| ▪ Glucose-Maltose-Test-Kit                  | Boehringer, Ingelheim |
| ▪ Cell-Titer-One-Solution-Proliferation-Kit | Promega, Mannheim     |

### **2.2.5 Nährmedien für Pilze und Bakterien**

Die Angaben beziehen sich, wenn nicht gesondert angegeben, auf 1 l Leitungswasser. Zur Herstellung der Festmedien wurden 1.5 % Spanagar zugegeben. Die in Tabelle 2-9 angegebenen Werte für die Zusammensetzung der Medien beziehen sich auf ein Gesamtvolumen von 1 l Leitungswasser. Die Medien mit einem M beginnend wurden für

Fermentationsansätze und die mit einem T beginnend für die Ausplattierung von Mikroorganismen für Agardiffusionstest-Analysen verwendet.

Bezeichnung des Mediums	Komponente	Eingesetzte Menge in g/l (oder pH)
▪ <u>M1</u> (HA-Medium)	Malzextrakt	10
	Glucose	4
	Hefeextrakt	4
		pH 5.5
▪ <u>M2</u> (HMG-Medium)	Malzextrakt	10
	Glucose	10
	Hefeextrakt	4
		pH 5.5
▪ <u>M3</u> (Doppelmalz-Medium)	Malzextrakt	10 pH 5.5
▪ <u>T1</u> (LB-Medium)	Bacto-Pepton	10
	Bacto Yeast Extrakt	5
	NaCl	5
		pH 7.2
▪ <u>T2</u> (Kartoffel-Glucose-Medium)	Potato Dextrose	24
	Broth	pH 5.5

**Tabelle 2-9: Zusammensetzung der Medien für die Kultivierung der Pilze und Bakterien auf Festagar, in Schüttelkolben oder in Fermenter-Kultur.**

## 2.2.6 Zusätzliche Zelllinien für die Analyse der Fermentationsprodukte

Die in Tabelle 2-10 beschriebenen Zelllinien wurden in Medien kultiviert, die in Tabelle 2-11 separat aufgeführt sind. Die Zelllinien A549/8 (und DLD1) wurden aufgrund ihrer guten iNOS-Induzierbarkeit für mRNA-, Protein-Analysen sowie Reporter-gen-Analysen (DLD-1 nur im Teil „Einfluss kleiner G-Proteine auf die iNOS-Expression“, siehe Kap. 2.3) verwendet.



Zelllinie	Herkunft	Wachstum	Literatur / Hersteller
▪ <u>HeLa-S3</u> (ATCC CCL 2.2)	Humanes epitheliales Cervix- Karzinom	adherente Zellen	<i>PUCK et al., 1956</i>
▪ <u>ECVecNOS(3.5)</u> <u>LucP1-neo</u>	Humane Blasen- Karzinom-ähnliche Zellen	adherente Zellen	KLEINERT, 1998
▪ <u>A549/8pGAS</u> <u>Luc-neo</u>	Humane Lungen- Alveolar-Karzinom- Zellen	adherente Zellen	KLEINERT, 2001

**Tabelle 2-10: Zelllinien und ihre Herkunft aus humanen Gewebe oder durch stabile Transfektion mit einem Reporter-Plasmid veränderte Zelllinien.**

Die HeLa-S3-Zelllinie wurde als „Reporter“-Zelllinie für Reporter-Gen-Analysen und bei der Vorstufen-Biosynthese-Analyse lediglich im Wirkstoff-Teil verwendet.

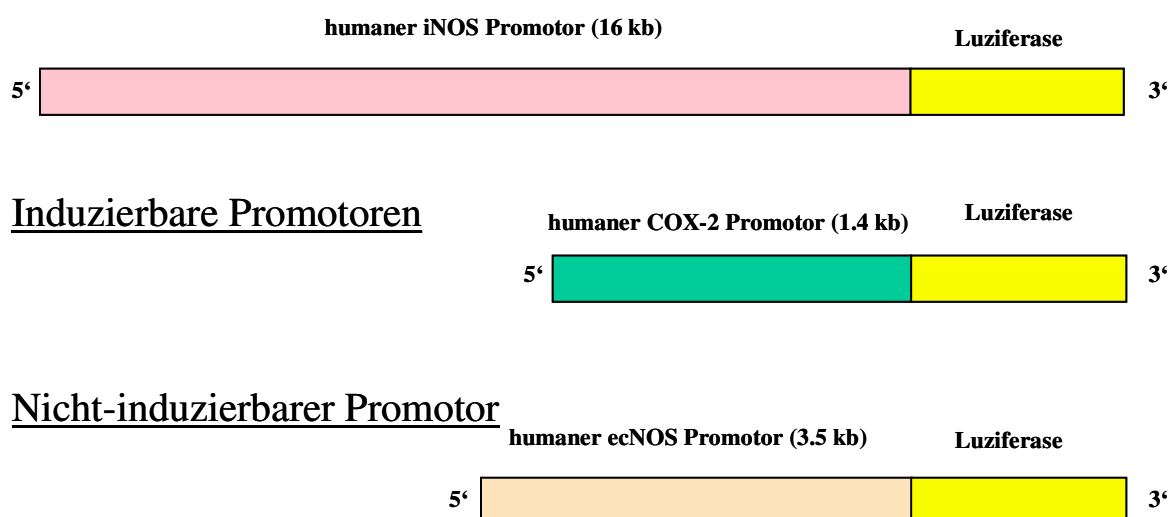
Zelllinie	Wachstum	FCS-Gehalt des Mediums (DMEM)	G-418-Gehalt des Mediums	Verwendung
▪ <u>A549/8</u>	Beschrieben in Tab. 2-1	Beschrieben in Tab. 2-2	Beschrieben in Tab. 2-2	<b><i>Griess-Analyse</i></b> <b><i>RNase-Verdauungs- schutzanalyse</i></b> <b><i>Stabile Transfektion</i></b> <b><i>Gelretentions-Analyse</i></b> <b><i>Proliferations-Assay</i></b>
▪ <u>A549/8pNOS</u> <u>2(16)Luc</u>	Beschrieben in Tab. 2-1	Beschrieben in Tab. 2-2	Beschrieben in Tab. 2-2	<b><i>Reporter-Gen-Analyse</i></b>

Zelllinie	Wachstum	FCS-Gehalt des Mediums (DMEM)	G-418-Gehalt des Mediums	Verwendung der Zelllinie
▪ <u>ECVpecNOS</u> (3.5)LucP1-neo	adherent	10 %	0,5 mg/ml	<i>Reporter-gen-Analyse</i>
▪ <u>HeLa-S3</u>	teilweise adherent	10 %	-----	<i>Transiente Transfektion (Reporter-gen-Analyse)</i>
▪ <u>A549/8pGAS</u> <u>Luc-neo</u>	adherent	5 %	0,5 mg/ml	<i>Reporter-gen-Analyse</i>

**Tabelle 2-11:** Eigenschaften der für die Analyse der für Reporter-gen- und RNA -Expressions-Analysen in Bezug auf den Wirkstoff-Einfluss auf die iNOS-Expression verwendete „normale“ und stabil transfizierte Zelllinien und deren Kulturmedien.

### 2.2.6.1 Promotor-Konstrukte vor Luziferase oder SEAP

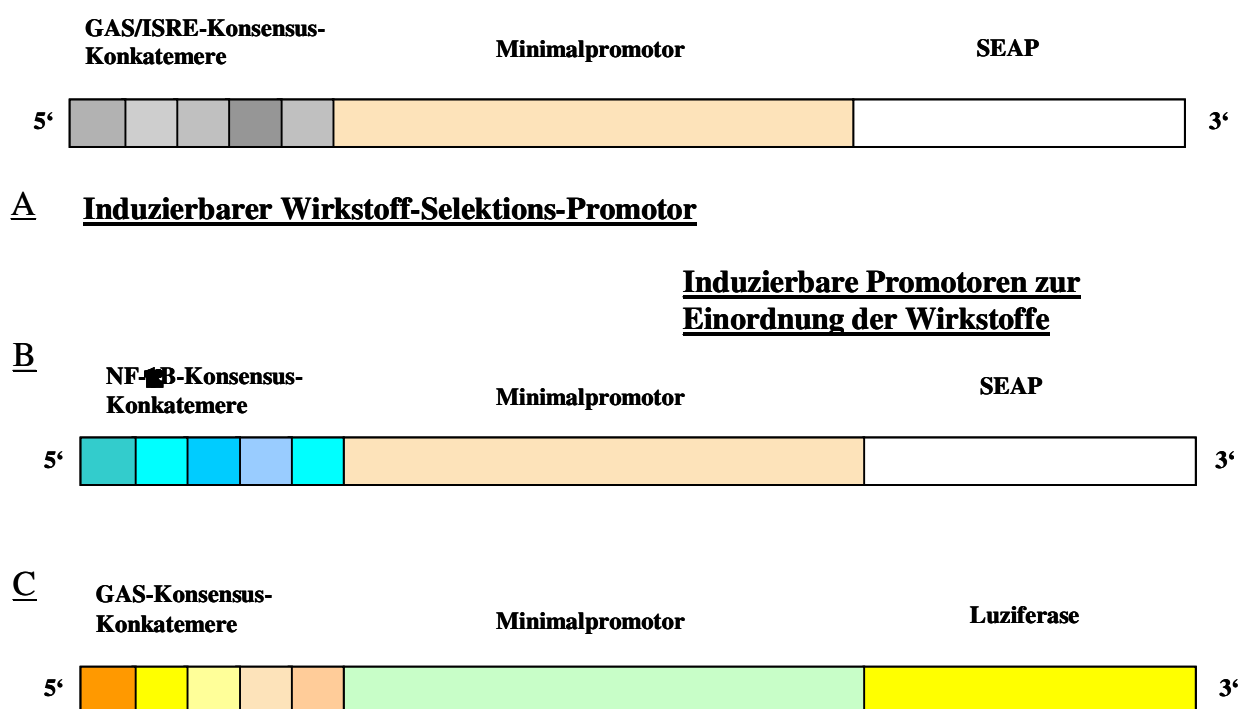
In Abbildung 2-1 sind die drei Promotor-Konstrukte vor Luziferase kloniert gezeigt, die zur Evaluation GAS/ISRE-positiver Rohextrakte und deren Aufreinigungsprodukte aus Pilzfermentationen auf transkriptioneller Ebene dienen.



**Abbildung 2-1:** Struktur der in humane Zelllinien transfizierten Promotoren, von denen die Luziferase-Expression abhängig ist. Diese allesamt stabil transfizierten Zelllinien wurden zur Evaluation der isolierten Pilzextrakte und deren Folgeprodukte in Bezug auf die Beeinflussung der Aktivität auf humane „entzündungsspezifische“ Promotoren verwendet.

Zur Selektion aktiver Rohextrakte aus Pilzfermentationen in Bezug auf die den GAS/ISRE-Enhancer bindenden Signalmoleküle wie STAT-1 $\alpha$  oder IRF-1, die als Antwort auf die IFN- $\gamma$ -abhängige Signaltransduktion als Faktoren aktiviert werden, wurde das pTKGAS/ISRESEAP-Konstrukt (Abbildung 2-2 (A)) verwendet. Da dieser Weg über JAK-2 und STAT-1 $\alpha$  als Hauptaktivierungsweg der iNOS in humanen Zelllinien angesehen wird, wurden die aus dieser Promotorstudie als Hemmstoffe hervorgegangenen Rohextrakte und Aufreinigungsprodukte auf die Inhibition auch des humanen iNOS-Promotors hin überprüft. Die Screenings auf die Nicht-Beeinflussung der Extrakte auf den ecNOS-Promotor hin dienten der Kontrolle der iNOS-Promotor-Spezifität.

Die induzierbaren Enhancer-abhängigen Minimalpromotoren vor SEAP (pGl<sub>3</sub>NFkB) bzw. Luziferase (pGASLuc) dienten der Einordnung der spezifischen Hemmung einzelner Transkriptionsfaktoren durch die isolierten Wirkstoffe (Abbildung 2-2 (B) und (C)).



**Abbildung 2-2: Struktur der in humane Zelllinien transfizierte Enhancer-Element-Konsensus-Sequenzen vor Minimal-Promotoren, von denen die SEAP- bzw. die Luziferase-Expression abhängig ist. Zwei induzierbare Enhancer-Element-abhängige Minimal-Promotoren vor SEAP, pTKGAS/ISRESEAP (A) und pGl<sub>3</sub>NFkB (B) wurden transient in heLaS3-Zellen transfiziert verwendet. pGASLuc (C) lag stabil in humane A549/8-Zellen transfiziert vor.**

### **2.2.6.2 Verwendung und Einstellung der Zellen für die Transfektion mit SEAP-Konstrukten**

Als Ausgangsvektor fand der Vektor pTK/SEAP (ERKEL *et al.*, 1996) Verwendung. In diesem Vektor liegt die spezifische Aktivator-bindende Stelle nahe einem Thymidin-Kinase-Basalpromotor des Herpes-simplex-Virus (HSV-TK). Die *cis*-Element-Reporter-Vektoren beinhalten fünf Tandem-Repeats von GAS/ISRE-Bindestellen oberhalb des SEAP-Gens. Der Enhancer-Element-freie Vektor pTK-SEAP enthält eine Multiple-Cloning-Site in der Nähe des HSV-TK-Basalpromotors. Nachdem die Enhancer-Elemente aktiviert sind, ermöglicht der TK-Promotor eine ausreichende Induktion des Reportergens, aber es kommt nur zu einer niedrigen Basalaktivität. Die HeLa-S3-Zellen wurde analog zu einer Elektroporations-Methode für Jurkat-Zellen (LOPEZ-CABRERA *et al.*, 1993) transient transfiziert (siehe Kapitel 2.2.4.1). Die optimalen Induktionsbedingungen wurden in HeLa-S3-Zellen bereits von der Arbeitsgruppe um PD Dr. G. Erkel für pTKGAS/ISRE SEAP eingestellt, der nach 48stündiger Induktion am besten induzierbar war und die Induktionsrate IFN- $\alpha$  und - $\beta$ -Behandlung von 5- bis 10-fach variierte.

### **2.2.7 Bakterien**

Für die DNA-Plasmid-Transformationen wurden DH5 $\alpha$ -Bakterienstämme verwendet, die mittels einer Kultivierung bei Raumtemperatur, Hitzeschock bei 50°C und anschließender Lagerung bei -70°C in 10 % DMSO kompetent gemacht wurden. Sie wurden bei der Präparation der für die Transfektionen verwendeten Plasmide zur Vermehrung genutzt.

### **2.2.8 Bearbeitete Pilzstämme**

#### **2.2.8.1 *Penicillium citrinum* (Stamm 48-93)**

Die 20-l-Fermentation wurde in einem Fermenter Typ C6, Biolafitte, Paris durchgeführt. Das eingesetzte Medium war M3, die Fermentationsbedingungen waren 3 l Luft/Minute, 120 Upm Rührergeschwindigkeit und 22°C konstante Umgebungstemperatur. Die 200 Liter-Fermentation wurde in einem Fermenter Typ Biostat U-200, Braun, Melsungen durchgeführt. Das eingesetzte Medium war M3, die Fermentationsbedingungen waren 3 l Luft/min, 120 U/min und 22°C.

### 2.2.8.2 Penicillium spec (Stamm 9-93)

Die 20-l-Fermentation wurde in einem Fermenter Typ Biostat A-20, Braun, Melsungen durchgeführt. Das eingesetzte Medium war M1, die Fermentationsbedingungen waren 3 l Luft/min, 120 Upm und 22°C.

### 2.2.9 Testmikroorganismen für die biologische Charakterisierung

Die in Kolle-Schalen auf spezifischem Agarmedium angezogene Bakterien und Pilze wurden in einer Konzentration von  $10^5$  Kolonien /Platte auf Platten gegossen und bei 4°C gelagert.

	Testorganismus (Gattung)	Wuchstemperatur (°C)	Nährmedium (siehe Tab. 2-9)
<b><u>Pilze</u></b>	▪ <i>Mucor miehei</i> TÜ 284	37	T1
	▪ <i>Paecilomyces variotii</i> ETH 114646	37	T1
	▪ <i>Penicillium notatum</i> *	27	T1
	▪ <i>Nematospora coryli</i> ATCC 10647	27	T1

<b><u>Gram-positive Bakterien</u></b>	▪ <i>Bacillus brevis</i> ATCC 9999	37	T2
	▪ <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	37	T2
	▪ <i>Sarcina lutea</i> *	37	T2

<b><u>Gram-negative Bakterien</u></b>	▪ <i>Enterobacter dissolvens</i> LMG 2683	27	T2
---	--	----	----

**Tabelle 2-12: Die für den Agardiffusionstest eingesetzten Mikroorganismen zur Charakterisierung der antifungischen oder -biotischen Aktivität getesteter Verbindungen.**

\* Die so gekennzeichneten Testorganismen für den Agardiffusionstest zur biologischen Charakterisierung wurden von der Stammsammlung des Lehrbereiches Biotechnologie der Universität Kaiserslautern zur Verfügung gestellt.

### 2.2.10 Medien für die transienten Transfektionsversuche mit pGl<sub>3</sub>NF- $\kappa$ B- und pTKGAS/ISRE-SEAP-Konstrukten in der HeLa-S3-Zelllinie

Zelllinie	Medium	Verwendetes Cytokingemisch	Zusatz von ....
▪ HeLa-S3	Dulbecco's OPTIMEM	TNF- $\alpha$ (10ng/ml)	0,5 % FCS (Elektroporation mit pGl <sub>3</sub> -NF $\kappa$ B-SEAP)
▪ HeLa-S3	Dulbecco's OPTIMEM	IFN- $\alpha$ (5 ng/ml)/ IFN- $\gamma$ (10 ng/ml)	0,5 % TCM (Elektroporation mit pTKGAS/ISRE-SEAP)

*Tabelle 2-13: Bei transienter Transfektion von humanen HeLa-S3-Zellen (nach der Elektroporations-Methode) verwendete Medien.*

Die Analyse der SEAP-Aktivität im Zellüberstand erfolgte bei HeLa-S3-Zellen 48 Stunden nach Zusatz des Cytokingemisches (siehe Tabelle 2-13) zur optimalen Induktion des Reportergens.

### 2.2.11 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Methoden zur Evaluation der isolierten Wirkstoffe

Puffer und Lösungen für die Gelretentions-Analyse :

- Protein-Lyse-Puffer
  - 10 mM Tris-HCl; pH7.4
  - 10 M NaCl
  - 5 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 0,5 % NP-40
  - mit Protease-Inhibitoren
- Kernprotein-Puffer
  - 50 mM Tris; pH 8.0
  - 30 % Glyzerin
  - 2 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 0.1 mM EDTA

- Gelretentions-Ladepuffer (10x)                      250 mM Tris-HCl  
   40 % Glycerin  
   0,2 % Bromphenolblau  
   0,2 % Xylencyanol
  
- Gelretentions-Laufpuffer (10x)                      67 mM Tris-HCl  
   33 mM NaCl  
   10 mM EDTA  
   pH 7.5
  
- Gelretentions-Binde-Puffer (5x)                      250 mM NaCl  
   50 mM Tris-HCl  
   2,5 mM DTT  
   2,5 mM EDTA  
   5 mM MgCl<sub>2</sub>  
   20 % Glycerin  
   0,25 mg/ml poly (dI-dC)  
   pH 7.5

#### **2.2.12 Verbrauchsmaterial verwendet in „Suche nach Wirkstoffen“**

- Einmal-Sterilfilter (Chromofil                      Macherey & Nagel, Düren  
EinmalfilterPES-45/15, 0,45 µm)
  
- Zellulosenitrat-Filter (0,45 µm                      Sartorius, Göttingen  
Porengröße)
  
- HPTLC-Platten (10 x 10 cm, Diol:                      Merck, Darmstadt  
Schichtdicke 0,2 mm und RP 18:  
Schichtdicke 0,25 mm, Merck, Darmstadt)
  
- Dünnschichtchromatographie-Platten (10 x                      Macherey & Nagel, Düren  
15 cm, Kieselgel-60: Schichtdicke 0,2 mm)

## 2.3 Spezielles Material zum Teil „Beeinflussung der iNOS-Expression durch G-Proteine der Rho-Familie“

Für die Arbeiten für die Präparation der Chemikalien zur Untersuchung der kleinen G-Proteine wurden spezielle Chemikalien und Zelllinien eingesetzt, die nur dort Verwendung fanden.

### 2.3.1 Chemikalien zur Analyse der Funktion der Rho-Proteine

▪ Agar	Roth, Karlsruhe
▪ Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
▪ Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel
▪ DMSO	Roth, Karlsruhe
▪ Farnesylpyrophosphat	Sigma, Deisenhofen
▪ Geranylgeranylpyrophosphat	Sigma, Deisenhofen
▪ Mevalonat	Sigma, Deisenhofen
▪ Atorvastatin	Goedecke-Parke-Davis, Freiburg
▪ Lovastatin	Sigma, Deisenhofen

Die Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, von Sigma in p.A.-Qualität bezogen. Die Lagerung der Vorrats-Lösungen erfolgt bei -20 °C.

Substanz	Beschreibung/Funktion	Chemische Bezeichnung
Atorvastatin (Atorva) (CI-981)	Hemmung der HMG-CoA-Reduktase (Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese) durch HMG-CoA-Kompetition als Strukturanalogon	[R-(R*,R*)]-2-(4-Fluorphenyl)-β, δ-dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-phenyl-4-[(phenylamino)-carbonyl]-1H-pyrrol-1-heptansäure (C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )



Substanz	Beschreibung/Funktion	Chemische Bezeichnung
Lovastatin (Lova) = Mevinolin (6 $\alpha$ -Methylcompactin) (MK-803)	Siehe Atorvastatin	(3R,5R)-7-[(1S,2S,6S,8S,8aR)-1,2,6,7,8,8a-Hexahydro-2,6-dimethyl-8-[(S)-2-methylbutyryloxy]-1-naphthyl]-3-hydroxyheptan-5-olid(C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub> )
Mevalonat (Mevalo, C <sub>6</sub> )	Produkt der HMG-CoA-Reduktase-Reaktion	DL- $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methyl- $\delta$ -valerolacton (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> )
Farnesylpyrophosphat (FPP, C <sub>15</sub> )	Entsteht als Zwischenprodukt der Cholesterinbiosynthese über mehrere Zwischenschritte aus Mevalonat, post-translationale Prenylierung von Proteinen	3,7,11-Trimethyl-2,6,10-Dodecatrien-1-ol-pyrophosphat•3NH <sub>3</sub> (C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> •3NH <sub>3</sub> )
Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, C <sub>20</sub> )	Wie FPP ein Nebenprodukt der Cholesterinbiosynthese, entsteht aus demselben durch Anhängen eines C <sub>5</sub> -Körpers, post-translationale Geranylgeranylierung von Proteinen	3,7,11,15-Tetramethyl-2,6,10,14-Hexadeca-tetraenyl-pyrophosphat•3NH <sub>3</sub> (C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> •3NH <sub>3</sub> )
<i>Clostridium difficile</i> Toxin B (TcdB)	Glucosyltransferase, Inaktivierung sämtlicher Rho-Proteine (Rho, Rac, Cdc42) durch UDP-Glucosylierung, kein Einfluß auf Ras-Proteine	

**Tabelle 2-14 : Beschreibung der speziellen Chemikalien zur Untersuchung der Funktion der Rho-GTPasen der Rho-Familie in Bezug auf die Regulation der iNOS.**

Substanz	MW in g/mol	Lösungsmittel	Vorratslösung	Bemerkung
Atorvastatin (Atorva) (CI-981)	578,64	DMSO	30 mM	freundlichst zur Verfügung gestellt von Gödecke/Parke Davis (Freiburg); liegt bereits in aktiver Form als $\text{Ca}^{2+}$ -Salz vor
Lovastatin (Lova) = Mevinolin (6 $\alpha$ -Methylcompactin) (MK-803)	404,5	Hydrolyselösung zur Aktivierung von Lovastatin	30 mM	durch alkalische Hydrolyse Umwandlung der inaktiven Lakton- in die aktive Hydroxysäure-Form
Mevalonat (Mevalo, C <sub>6</sub> )	130,1	Hydrolyselösung zur Aktivierung von Mevalonat	100 mM	Spaltung des Laktonrings durch alkalische Hydrolyse
Farnesylpyrophosphat (FPP, C <sub>15</sub> )	433,8	MeOH : NH <sub>4</sub> OH (10 mM) = 7:3	2,31 mM (1 g/l)	
Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, C <sub>20</sub> )	502,0	MeOH : NH <sub>4</sub> OH (10 mM) 7:3	1,99 mM (1 g/l)	
<i>Clostridium difficile</i> Toxin B (TcdB)	(270 kDa)	PBS + 20 % Glycerin (v/v)	1 µg/µl	freundlichst zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. C. von Eichel-Streiber (Mikrobiologisches Institut der Universität Mainz)

**Tabelle 2-15: Charakterisierung und Einsatz der speziellen Chemikalien zur Untersuchung der Funktion der Rho-GTPasen der Rho-Familie in Bezug auf die Regulation der iNOS.**

### 2.3.2 Medien, Puffer und Lösungen für die Bakterienkultur

- LB-Medium
  - 10 g Bactotrypton (Casein)
  - 10 g NaCl
  - 5 g Yeast
  - pH 7.0
  - ad 1 Liter Millipore-Wasser; autoklaviert
- P1-Puffer (DNA-Maxi Kit, Qiagen)
  - 50 mM Tris-HCl pH 8.0
  - 10 mM EDTA
  - und Zusatz von 100 µg/ml RNase A
- P2-Puffer (DNA-Maxi Kit, Qiagen)
  - 200 mM NaOH
  - 1 % SDS
- P3-Puffer (DNA-Maxi Kit, Qiagen)
  - 3 M Kalium-Acetat pH 5.5
- QBT-Puffer (DNA-Maxi Kit, Qiagen)
  - 750 mM NaCl
  - 50 mM MOPS pH7.0
  - 15 % Isopropanol
- QC-Puffer (DNA-Maxi Kit, Qiagen)
  - 1 M NaCl
  - 50 mM MOPS pH7.0
  - 15 % Isopropanol
- QF-Puffer (DNA-Maxi Kit, Qiagen)
  - 1,25 M NaCl
  - 50 mM MOPS pH7.0
  - 15 % Isopropanol
- SOB-Medium
  - 2 % (w/v) Bacto-Trypton
  - 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
  - 10 mM NaCl
  - 2,5 mM KCl
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 6.7-7.0

- SOC-Medium
  - 20 g Bactotrypton (Casein)
  - 5 g Yeast
  - 0,6 g NaCl
  - 0,186 g KCl
  - 2 g MgCl<sub>2</sub>
  - in 1 l Millipore-Wasser gelöst; 20 Minuten autoklaviert; Frischer Zusatz von 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 20 mM Glucose (steril filtriert)
- TB-Medium
  - 10 mM PIPES; pH 6.9
  - 15 mM CaCl<sub>2</sub>
  - 250 mM KCl
  - 55 mM MnCl<sub>2</sub>

### 2.3.3 Zelllinien zur Analyse der Beeinflussung der iNOS durch kleine G-Proteine

Angaben zu A549/8-Zellen finden sich bereits im allgemeinen Teil, da diese Zelllinie auch im Wirkstoff-Teil verwendet wurde (Tabelle 2-1).

Zelllinie	Herkunft	Wachstum	Literatur / Hersteller
▪ <u>DLD1</u> (ATCC CCL 221)	Humane Kolon-Karzinom-Zellen	Adherent, auch überwachsend, heterogen	<i>CORDEIRO et al., 1986</i>
▪ <u>DLD1pNOS 2(16)Luc</u>	Humane Kolon-Karzinom-Zellen	Adherent, auch überwachsend, heterogen	RODRIGUEZ-PASCUAL, 2000

**Tabelle 2-16 : Verwendete Zelllinien und ihre Herkunft aus humanen Gewebe und verwendete durch stabile Transfektion mit einem Reporter-Plasmid transfizierte Zelllinien.**

Die in Tabelle 2-16 beschriebenen Zelllinien wurden in Medien kultiviert, die in Tabelle 2-17 gesondert aufgeführt sind.

<b>Zelllinie</b>	<b>FCS-Gehalt des Mediums (DMEM)</b>	<b>G-418-Gehalt des Mediums</b>
▪ DLD1	10 %	-----
▪ DLD1pNOS2 (16)Luc	10 %	0,5 mg/ml

*Tabelle 2-17: Für die Analyse der verwendeten Zelllinien und stabil transfizierten Zelllinien für Reporter- und RNA-Expressions-Analysen in Bezug auf die iNOS-Expression reguliert von kleinen G-Proteinen.*

### **3 Methoden**

#### **3.1 Allgemeine Methoden**

##### **3.1.1 Wachstumsbedingungen, Vermehrung und Aufbewahrung von Zelllinien und Bakterienstämmen**

###### **3.1.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung der Zelllinien**

Zur Vermehrung der Zelllinien wurde eine Sicherheitswerkbank der Klasse II (Firma Nunc, Wiesbaden) genutzt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Zur Erhaltung vitaler Kulturen wurde spätestens nach 3 Tagen das Medium erneuert oder der Zell-Monolayer nach dem Erreichen einer hohen Zelldichte (Konfluenz) mittels Trypsin (0,5 U/ml in PBS) vom Boden abgelöst und die Zellsuspension danach bis zu höchstens 1:20 mit Kulturmedium verdünnt. Die Aufbewahrung der Zelllinien oder der stabil transfizierten Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff, nachdem den Zellen ein Gemisch aus 90 % FCS und 10 % DMSO zugegeben worden war. Zum Starten einer neuen Zellkultur wurden bei –171°C gelagerten Zellen (1-ml-Aliquotes) langsam aufgetaut und mit 9 ml Kulturmedium verdünnt. Anschließend wurden die Zellen durch 5minütige Zentrifugation (RT, 120 x g) pelletiert und der Überstand abgesaugt, um das DMSO zu entfernen. Nach Resuspendierung in Medium wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit Filter Top im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Phenolrot-haltiges DMEM-Medium wurde für A549/8 Zellen mit 5 % und für alle anderen Zelllinien mit 10 % Fötalem Kälberserum (FCS) versetzt. Es wurde dabei FCS verwendet, das zuvor zur Inaktivierung von Komplementfaktoren 40 min bei 56 °C im Wasserbad inkubiert worden war und dessen Endotoxin-Gehalt unter 1 ng/ml lag. Darüber hinaus wurden dem Kulturmedium für alle Zelllinien gleichermaßen L-Glutamin (2 mM), Pyruvat (1 mM) sowie Penicillin/Streptomycin (100 U/ml / 100 µg/ml) zugesetzt. Das A549/8-Medium enthielt zudem noch Polymyxin B (2,5 µg/ml = 17,5 U/ml). Stabil transfizierten Zellen wurden während der Selektion in 1 mg/ml Gentamicin (G-418) und anschließend nur noch in 0,5 mg/ml kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen zum Passagieren mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend durch 5minütige Inkubation mit 1 ml neuem Medium wieder in die Kulturflasche eingesät. Der übrige Anteil wurde für die Versuche in entsprechende Zellkulturschalen oder Loch-Platten

ausgesät. Nach jeweils 7-8 Passagen fand ein Wechsel der Kulturflasche statt. Nach ca. 20 Passagen wurden die Zellen verworfen und zur Weiterarbeit frische Zellen aufgetaut (siehe vorige Seite).

### **3.1.1.2 Aufbewahrung von Bakterienstämmen**

Zur Lagerung der Bakterien wurden nach Kultur der Bakterien ü. N. mit LB-Puffer Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 400 µl der Bakteriensuspension mit 600 µl 60 % Glycerinlösung (in LB-Puffer) versetzt und anschließend bei –70°C eingefroren.

### **3.1.2 Generelle Verwendung der Stamm-Zelllinien und der stabil transfizierten Zelllinien**

#### **3.1.2.1 Induktion von Zellen**

Für mRNA-Expressions-Analysen wurden die Zellen in Ø 9,4 cm Zellkulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz in FCS- und Phenolrot-haltigem Kulturmedium kultiviert. Um die Induzierbarkeit der iNOS-Expression durch Cytokine zu verbessern, enthielt das Inkubationsmedium dagegen kein oder nur geringe Mengen FCS. Außerdem wurden die Zellen 18 Stunden mit Mangelmedium vorinkubiert. Phenolrot-freies Medium wurde verwendet, damit der Überstand zur Bestimmung der NO-Produktion mittels Griess-Analyse verwendet werden konnte. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte bei A549/8-Zellen 8 Stunden nach Zusatz eines Cytokin-Gemisches (100 U/ml IFN- $\gamma$ ; 50 U/ml IL-1 $\beta$ ; 10 ng/ml TNF- $\alpha$ ) oder einzelner Cytokine zur Induktion der untersuchten Gene. Für die Griess-Analyse wurden A549/8-Zellen in 24-Loch-Mikrotiterplatten ( $5 \cdot 10^5$  Zellen/Loch) eingesät und vor Erreichen der Konfluenz 36 h mit Inkubationsmedium behandelt. Die für die Gewinnung von Kernextrakten vorgesehenen A549/8-Zellen wurden lediglich 4 h in Mangelmedium mit der Substanz inkubiert und anschließend nur 30 Minuten mit dem Cytokin-Gemisch induziert. Bei Reporter-Analysen mit dem humanen eNOS-Promotor stabil transfiziert in ECV-Zellen (ECVpecNOS(3.5)P1-Luc) wurden die Zellen für 4,5 h mit den Pilzprodukten inkubiert (vgl. Tabelle 3-1).

<b>Zelllinie</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Vorbehandlung mit Extrakten / Verbindungen [h.min]</b>	<b>Induktionsdauer [h.min]</b>
A549/8	mRNA-Induktion	18.00	8.00
DLD-1	mRNA-Induktion (nur in Teil „Kleine G - Proteine“ verwendet)	18.00	6.00
Balb 3T3	mRNA-Induktion (nur in Teil „Kleine G - Proteine verwendet)	18.00	8.00
A549/8 pNOS2(16)Luc- neo	iNOS-Promotor- Induktion	18.00	4.30
DLD1 pNOS2(16)Luc- neo	iNOS-Promotor- Induktion (nur in Teil „Kleine G - Proteine verwendet)	18.00	4.30
A549/8pGASLuc- neo	GAS/ISRE- Induktion	18.00	6.00

**Tabelle 3-1: Bedingungen für die Cytokin-abhängige Zellinduktion in humanen und murinen Zelllinien.** Optimale Induktionszeiten für Anwendungen betreffend den humanen iNOS-Promotor und die iNOS-Expression in verwendeten Zelllinien. Es sind nur die Zeiten für stabil transfizierte Zelllinien gezeigt (transient durchgeführte Promotor-Analysen wurden für den COX-2-Promotor siehe Kap. 3.2.4.4 optimiert).



### **3.1.3 Expressions-Analysen auf mRNA-Ebene**

Die Zellen wurden lysiert und aus der Suspension RNA gewonnen, die für die RNase-Verdauungsschutzanalyse verwendet wurde.

#### **3.1.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen**

Die Geräte, die während der Arbeiten mit RNA benötigt wurden waren vorher zur Inaktivierung von RNasen autoklaviert bzw. hitzesterilisiert worden. Es wurden für die Arbeiten mit RNA zum Schutze der RNA vor den RNasen der Handoberfläche stets Einmalhandschuhe getragen.

Nach der Inkubation der Zellen in kleinen oder großen Kulturschalen (6 bzw. 9,6 cm Durchmesser) wurden diese durch Zugabe von 600 bzw. 800 µl GIT-Puffer lysiert. Durch anschließende Extraktion mit 1 Volumen saurem Phenol (pH 4.0), 0.2 Volumen Chloroform und 0.1 Volumen 2 M Natriumacetat pH 4.0 ging die RNA in die wässrige Oberphase über. Nachfolgend wurde die Lösung mit einem Volumen 2-Propanol p. A. versetzt und mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 Upm, 4°C für 30 min wurde das RNA-Pellet zur Entfernung der organischen Reste mit 1 ml 80 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation bei 4°C und 13.000 Upm für 20 min wurde die RNA je nach ungefähr eingesetzter Zellmenge pro Kulturschale in 200 bis 500 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die optische Dichte der Lösung bei 260 nm wurde am Photometer (Beckmann) bestimmt und daraus die RNA-Konzentration berechnet (1 Absorptionseinheit entspricht ca. 40 µg RNA/ml Lösung).

#### **3.1.3.2 Expression relevanter Enzyme für entzündliche Vorgänge im humanen und murinen System (RNase-Verdauungsschutzanalyse)**

Zur Herstellung radioaktiv markierter RNA-Antisense-Transkripte (Sonden) wurden folgende Plasmide als Matrizen der Reaktionen verwendet:

Plasmid	Restriktions- enzym	RNA- Polymerase	Geschütztes Fragment	Unverdaute Sonde
pCR-INDNO5A3A-Human_del Sma	<i>Eco 47 III</i>	T7	192 nt	271 nt
pCR-INDNO5A3A-Human_del Sma	<i>Not I</i>	T7	380 nt	471 nt
pXcm-huNOS2-5P/3P	<i>Bam HI</i>	T7	315 nt	397 nt
PCR-iNOS-mouse	<i>Nco I</i>	T3	184 nt	271 nt
pCR-luc-pGL <sub>2</sub>	<i>Eco RI</i>	T7	230 nt	293 nt
pKS-human- $\beta$ Aktin-Eco/Nar	<i>Hind III</i>	T7	110 nt	187 nt
PCR- $\beta$ -Actin-mouse	<i>Asp 718</i>	T3	108 nt	222 nt
pKS-human- $\beta$ Aktin-Eco/Nar	<i>Hind III</i>	T7	110 nt	187 nt
phGAPDH human 105	<i>Eco RI</i>	T3	105 nt	183 nt

**Tabelle 3-2 : In der RNase-Verdauungsschutzanalyse verwendete cDNA-Matrizen für die in vitro-Transkription.**

Die Plasmide wurden mit den in Tabelle 3-2 angegebenen Enzymen linearisiert und anschließend zweimal mit einem Gemisch aus Phenol (Tris-gesättigt) und Chloroform im Verhältnis 1:1 nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat extrahiert. Die DNA wurde dann aus der wässrigen Phase gefällt. Nach Waschen der DNA mit 70% Ethanol und erneuter Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde die resultierende DNA in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und die optische Dichte der Lösung bei 260 nm gemessen. Eine Absorptionseinheit entspricht dabei 50  $\mu$ g DNA/ml Lösung; somit konnte die Lösung auf 0,5  $\mu$ g DNA/ $\mu$ l eingestellt werden (siehe Tab 3-1). Unter Verwendung von 50  $\mu$ Ci für die iNOS-Sonde oder 20  $\mu$ Ci für  $\beta$ -Aktin-Sonde [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP (800 Ci/mMol, ICN) und in Anwesenheit von CTP-, ATP- und GTP-Nukleotiden (je 0.25 mM), 40 U RNase-Inhibitor, 1x Transkriptionspuffer und 10 U der entsprechenden RNA-Polymerase wurde 1  $\mu$ l der Plasmid-DNA in vitro transkribiert. Zusätzlich wurden dem Reaktionsansatz für die GAPDH oder  $\beta$ -Aktin 15  $\mu$ M und für andere Sonden 5  $\mu$ M nicht markiertes UTP zugesetzt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und danach 20 U DNase I in 30  $\mu$ l Transkriptionspuffer (1x) zugesetzt und die Ansätze erneut für 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. In einem Präzipitationsschritt nach Zupipettieren von 500  $\mu$ l Ethanol

p.A. und 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat sowie 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O und 20 µg t-RNA wurden die nicht in die Sonde eingebauten Nukleotide vom Transkript getrennt. Nach der mindestens einstündigen Fällung bei -70°C und einer Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4°C für 30 min erfolgte ein Waschschrift mit 1 ml 80% Ethanol und das Lösen der RNA-Transkripte in 100 µl 0.1 % Lauroylsarcosin-DEPC-H<sub>2</sub>O-Lösung. Danach erfolgte die Ermittlung der Zerfälle pro Minute (Bq) pro µl der Sondenlösung, aus deren Resultat die einzusetzende Menge an Sondenlösung pro RNA-Probe zu berechnen war. Für die zu untersuchende RNA von 20 – 30 µg wurden 300.000 cpm der gelösten spezifischen Sonde (iNOS, Luziferase) und 40.000 cpm der Kontroll-Sonde (β-Aktin, GAPDH) zur Normalisierung des spezifischen Signals in Bezug auf die RNA-Menge, die proportional zur Expression des „Haushaltsgens“ sein sollte, zugesetzt. Die Proben wurden nun im Präzipitationsansatz für mindestens eine Stunde bei -70°C gefällt, bei 13.000 Upm zentrifugiert, mit 80% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und danach das Pellet in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Verdampfen des Wassers in der Speedvac für ca. 30 min wurde die RNA in 40 µl des RNA/RNA-Hybridisierungspuffers gelöst, die Lösung in wasserdichte Schraubdeckel-Reagenzgefäße überführt und die Proben nach Denaturierung bei 95°C für 30 min bei 51°C ü. N. inkubiert. Die Degradation der einzelsträngigen, nicht von der Sonde gebundenen RNA erfolgte durch Zugabe von 300 µl RNase A/T1-Verdauungs-Puffer mit 40 µg/ml RNase A und 2 µg/ml RNase T1 während einer 40-minütigen Inkubation bei 30°C. Zum Abstoppen der RNase-Reaktion erfolgte nun die Zugabe von Proteinase K (10 µg/ml in Proteinase K-Puffer) und nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C eine Extraktion in 500 µl Phenol-Chloroform (pH 8). Nach der Präzipitation der aus der Extraktion resultierenden wässrigen Oberphase in 1 ml Ethanol p.A. und 30-minütiger Zentrifugation (13.000 Upm, 4°C), Waschen in 80 % Ethanol und erneuter Zentrifugation wurden die Proben in der Speedvac getrocknet und in 7 µl Formamid-Probenpuffer gelöst. Die Auftragung erfolgte auf ein 6 %-iges denaturierendes Polyacrylamidgel mit 8 M Harnstoff. Die Elektrophorese wurde für etwa 90 min (pro Gel 25 mA constant) durchgeführt und die Gele nach 10-minütiger Lagerung in Fixierlösung für 45 min mittels Geltrockner bei 80°C getrocknet. Die Autoradiographie erfolgte ü. N. bei -70°C.

Die quantitative Auswertung wurde mittels eines Phospho-Imager-Systems (BioRad) durchgeführt, wobei die Gele ü. N. auf einen Phospho-Screen aufgelegt wurden. Die Analyse wurde mittels der densitometrischen Auswertung der iNOS- oder Luziferase-Signale im Vergleich zur Auswertung der β-Aktin- bzw. GAPDH-Signale bewerkstelligt.

### **3.1.4 Luziferase-Reportergen-Analyse**

In stabil mit einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luziferase-Gen transfizierten Zellen konnte somit durch Luziferaseaktivitäts-Messung der Einfluss verschiedener Substanzen auf die iNOS-Promotoraktivität getestet werden. Die Messung mit Hilfe des Luminometers erfolgte mit jeweils 20 µl des Zell-Lysats, die auf den Boden eines 5 ml-Messröhrchens pipettiert wurden. Die das Licht emittierende Luziferase-Reaktion wurde durch automatische Injektion von 100 µl des Luziferase-Substrates gestartet. Die während der folgenden 10 Sekunden emittierte Lichtmenge wurde vom Luminometer in ‘Light -Units’ ausgegeben und repräsentiert die Luziferaseaktivität. Neben der Luziferaseaktivität der Proben wurde auch die von 20 µl des entsprechenden, zum Lysieren der Zellen verwendeten Passive-Lysis-Buffers bestimmt, um sie später als Hintergrundaktivität von allen anderen Messwerten abziehen zu können.

#### **3.1.4.1 iNOS-Promotor-Analyse**

Für die iNOS-Promotor-Analysen wurden stabil mit dem Plasmid pXP<sub>2</sub>NOS2(16)Luc transfizierte A549/8-Zellen (bzw. DLD-1-Zellen im Teil ‘G-Protein-Einfluß auf iNOS-Expression’) in 24 -Loch-Platten ausgesät. Nach Erreichen von ca. 80 % Konfluenz wurde das Medium gegen FCS-freies Medium ohne Phenolrot ausgetauscht, welches die zu testenden Substanzen oder nur das Lösungsmittel, in dem diese gelöst waren, enthielt. Die Induktion mit den unter Kap. 2.1.4.2 beschriebenen Cytokinen als Gemisch (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ ) erfolgte für den iNOS-Promotor für 4,5 h und wurde durch Abstoppen mit 200 µl des Passive-Lysis-Puffers beendet. Nach Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 13.000 Upm, 4°C für 15 min wurde der Überstand für die Luziferase- bzw. die Bradford-Protein-Bestimmung verwendet oder bis dahin bei –20°C gelagert. Die Bestimmung der Luziferase-Aktivität erfolgte nach Kap. 4.1.4.1 mit 20 µl des Überstandes und die für die Normalisierung benötigte Protein-Bestimmung nach Kap. 4.1.4.2 mit 10 µl des Überstandes.

Zur Auswertung wurde der ermittelte Luziferase-Wert durch den ermittelten Wert in µg Protein dividiert, um eine quantitative Auswertung der relativen Luziferase-Aktivität zu bewerkstelligen.

### **3.1.4.2 eNOS-Promotor-, COX-2-Promotor-Analyse und die Analyse von Transkriptionsfaktoren mittels Luziferase-Assay**

Für fast alle anderen Promotoranalysen wurde jeweils eine Vorinkubation der transfizierten Zellen mit Medium ohne FCS durchgeführt und bei Testreihen mit isolierten Extrakten oder Substanzen diese in den jeweiligen Konzentrationen auf den Zellen gegeben. Während der Induktionszeit (siehe Tabelle 3-1) werden zusätzlich Cytokine oder TPA zugegeben. Die Dauer der Cytokinwirkung war bei den unterschiedlichen Promotoren und Transkriptionsfaktor-Luziferase-Konstrukten von der Dauer her unterschiedlich (Tabelle 3-1). In den Untersuchungen zur eNOS-Promotor-Aktivität wurde nach der Inkubation der Zellen ü.N. in Medium ohne Serum für 18 h die zu untersuchenden Extrakte bzw. Verbindungen zugegeben und diese dann für eine Zeit von 4h und 30 min inkubiert und anschließend lysiert.

### **3.1.4.3 Bradford-Proteinbestimmung**

Die Absorption des chromogenen Bradford-Reagens, das mit Proteinen unter Farbwechsel interagiert, ist ein Maß für die Menge der in Lösung vorhandenen Proteine, also eine kalorimetrische Konzentrationsbestimmungs-Methode für Proteinlösungen (nach REDINBAUGH & CAMPBELL, 1985; BRADFORD, 1976). Durch die Bindung des Farbstoffes Coomassie-brilliant-Blue an das Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum des im Bradford-Reagens enthaltenen Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm. Die Absorption bei 595 nm ist also der Proteinmenge proportional. Zur Messung wurden jeweils 5 –10 µl des Zelllysats in ein Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert und ad 100 µl mit *Aqua bidest.* ergänzt. Die Eichgerade wurde mit 0-0,25-0,5-1-2-3-5-7-10 µg Protein (BSA) in Doppelansatz ad 100 µl *Aqua bidest.* vorgelegt und mit jeweils 5 –10 µl des 1x Passive-Lysis-Buffers versetzt, um Hintergrundeffekte des Puffers auszuschließen. Danach wurden 100 µl des 40%-igen Bradford-Reagens (40 %) zu Eichkurven- und Proben-Lösungen hinzugegeben und die Absorption bei 595 nm nach wenigen Minuten im ELISA-Reader gemessen. Die Berechnung der jeweiligen Proteinmengen pro Probe wurden vom Kalkulationsprogramm Delta Soft II automatisch durchgeführt.

### **3.1.5 Klonierung zur Herstellung von Reporter-gen-Konstrukten und Matrizen für die *in vitro*-Transkription**

#### **3.1.5.1 Herstellung kompetenter E.coli-Zellen (DH5 $\alpha$ )**

Die Behandlung der Bakterien zur Erhöhung ihrer Bereitschaft, DNA aufzunehmen (kompetente Bakterien), erfolgte nach der Inoue-Methode, die auf der chemischen Transformation der Bakterien beruht (INOUE *et al.*, 1990). Zuerst wurden die E. coli-Bakterien aus alten Präparationen in LB-Medium über Nacht vermehrt. Zur Vermehrung wurden die Bakterien in 250 ml SOB-Medium bei 18°C in Schüttelkultur inkubiert und nach Erreichen einer O.D. von ca. 0,6 (gemessen bei 600 nm) auf Eis gestellt. Nach 10 Minuten wurden die Bakterien 10 min bei 4°C und 2.500 x g (3000 Upm in einer Beckman J-6B-Zentrifuge) zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 80 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert und erneut 10 min bei 2.500 x g und 4°C zentrifugiert. Nachdem die Zellen in 20 ml eiskaltem TB-Medium resuspendiert worden waren, wurde DMSO zu einer finalen Konzentration von 7 % zugegeben (ca. 1,4 ml) und die Zellen 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach der Aliquotierung der Suspension in 1-2 ml wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### **3.1.5.2 Transformation von Bakterien**

Zur Transformation von Bakterien zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden kompetente Bakterien (z.B. E.coli-Stamm DH-5 $\alpha$ ) aus -70°C-Stocks auf Eis aufgetaut und anschließend 100  $\mu$ l dieser Lösung mit der zu transformierenden DNA versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme der DNA in die Zellen wurde der Ansatz für exakt 2 min bei 42°C in ein Wasserbad gestellt. Danach wurden die Bakterien mit 900  $\mu$ l SOC-Puffer versetzt und bei 37°C 1 Stunde unter Schütteln inkubiert. 500  $\mu$ l der Bakteriensuspension wurden auf einer LB-Agarplatte mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin ausplattiert und die Bakterien wuchsen bei 37°C über Nacht an. Zur Überprüfung der korrekten Transformation mit dem zu vermehrenden Plasmid wurden Mini-Präparations-Kulturen angelegt.

#### **3.1.5.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA**

Die Isolierung von Plasmid-DNA im Maßstab von 10  $\mu$ g erfolgte nach der Methode

von SAMBROOK *et al.* (1989). Mittels eines sterilen Zahnstochers wurde eine Bakterienkolonie in ein Röhrchen mit 3 ml des LB-Mediums mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Dieser Vorgang wurde mit 4-10 unterschiedlichen Bakterienkolonien pro Transformation durchgeführt. Nach 18-stündigem Wachstum der Bakterien ü. N. wurde von der Kultur 1 ml abgenommen und in einem Reagenzgefäß 10 min bei 6.000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Danach wurde nach Dekantieren des Überstandes das Pellet mit 100 µl Maniatis I-Lösung versetzt, geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 200 µl Maniatis II-Lösung versetzt und wiederum 5 min bei 4°C inkubiert. Dann wurden noch 150 µl des Maniatis III-Puffers zugegeben und die Lösung 15 min bei 4°C und 13.000 Upm zentrifugiert. Der abgenommene Überstand wurde mit 600 µl Phenol/Chloroform-Lösung versetzt, gut gemischt und wieder bei 13.000 Upm und 4°C 5 min zentrifugiert. Die wässrige Oberphase enthielt die DNA und wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt, bevor 1 ml Ethanol absolut zugegeben und die DNA 10 min bei RT präzipitiert wurde. Das nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm und 21°C entstandene DNA-Pellet wurde mit 400 µl 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Dekantieren des Alkohols getrocknet und in 50 µl TE-Puffer gelöst. Die DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert. Anschließend wurden mit der Plasmid-DNA Kontrollschnitte durchgeführt, um die Korrektheit des Plasmid-DNA zu überprüfen.

#### **3.1.5.4 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA (Qiagen Plasmid Maxi Kit)**

Als Inokulum für die Maxi-Plasmid-DNA-Präparation wurden Mini-Präparations-Bakterienlösung das gewünschte Plasmid enthaltender Klone eingesetzt. Davon wurden als Starterkultur 250 µl in 250 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin eingesetzt. Nach Schütteln dieser Kultur über Nacht wurde die Maxi-Präp-DNA wie folgt gewonnen: die Bakterienkultur wurde in Zentrifugenbecher überführt und 15 min bei 4°C in einer Beckmann JA-10-Zentrifuge bei 6.000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und das Bakterienpellet in 10 ml von Puffer P1 unter mäßigem Schütteln gelöst. Nach Versetzen dieser Lösung mit 10 ml Puffer P2 und vorsichtigem Mischen, um ein ungewolltes Scheren der chromosomalen DNA durch verursachte Scherkräfte zu vermeiden, wurde das Gemisch 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 10 ml Puffer P3 zugegeben, 20 min auf Eis stehen gelassen und nach Mischen bei 11.400 Upm, 4°C 30 min im Beckmann-Rotor JA-70 zentrifugiert. Der im optimalen Fall klare Überstand wurde über einen Papierfilter

gegeben und anschließend das resultierende Eluat über die mit 10 ml QBT-Puffer eluierte Qiagen Tip500-Säule gegeben. Die Säule wurde danach zwei Mal mit 30 ml des QC-Puffers gespült und dann die DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert und das Eluat in einem 50ml-Röhrchen aufgefangen. Nach Versetzen des Eluats mit 10,5 ml Isopropanol und 10 min auf Eis wurde die Lösung 30 min bei 9.800 Upm im Beckmann JS-13-Rotor unter Kühlung zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach erneuter zehnminütiger Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes getrocknet und in 250 µl TE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die O.D. der Lösung bei 260 nm bestimmt, und 1-2 µg der Plasmid-DNA nach einem Kontroll-Schnitt auf ein Agarose-Gel aufgetragen und so die Güte der Plasmid-DNA dokumentiert.

#### **3.1.5.5 Restriktion von Plasmid-DNA (Kontroll-Schnitte)**

1-2 µg der Plasmid-DNA wurden anhand geeigneter Restriktionsenzyme in mehrere DNA-Fragmente bestimmter Länge zerlegt, um die Identität der Plasmid-DNA genau bestimmen zu können. Nach einem Kontroll-Schnitt wurden sie auf ein Agarose-Gel (0,8 bis 1,5 %) aufgetragen und so die Richtigkeit der Plasmid-DNA dokumentiert (Kap. 3.1.6.2).

#### **3.1.6 Analyse von Nukleinsäuren**

##### **3.1.6.1 Bestimmung der optischen Dichte von Nukleinsäurelösungen zur Messung der DNA/RNA-Konzentration**

Die Konzentrationsermittlung von Nukleinsäuren wie DNA und RNA erfolgten photometrisch am UV/Vis-Spektrometer. Die Absorption der verdünnten Nukleinsäurelösungen wurde in den Wellenlängen von 260 und 280 nm bestimmt, wobei der erste Wert mit der Nukleinsäure-Konzentration und der zweite mit der Proteinkonzentration korreliert. Unter Berücksichtigung des Lambert-Beer-Gesetzes konnte man die Konzentrationen nach folgenden Gleichungen berechnen:

$$1 \text{ Absorptionseinheit (260 nm)} = 50 \text{ µg/ml ds DNA}$$

$$1 \text{ Absorptionseinheit (260 nm)} = 40 \text{ µg/ml ds RNA}$$

Als Reinheitskoeffizient lässt sich der Quotient aus der  $A_{260}/A_{280}$  berechnen. Dieser sollte stets zwischen 1,6 und 2 liegen. Liegt dieser niedriger handelt es sich um eine Kontami-



nation mit Protein, liegt der Wert darüber, so handelt es sich um eine Phenol-Verunreinigung, welche durch wiederholtes Waschen mit 80 % zu vermeiden war. Der optimale Bereich des  $A_{260}/A_{280}$ -Quotienten von 1,6 – 2,0 wurde bei den molekularbiologischen Analysen stets eingehalten.

### **3.1.6.2 Elektrophorese zur Analyse von DNA**

Zur Auftrennung der zu analysierenden DNA-Fragmente nach Kontroll-Restriktionen wurden zumeist 0.8 %ige Agarose-Gele verwendet, die vor dem Gießen mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid in Endkonzentration versetzt wurden. Zur Auftrennung der von 0,8 – 7 kb langen DNA-Stücke wurden als Marker pcDNA x *Hinf I* bzw.  $\lambda$  x *Hinf I* als Molekulargewichtsmarker verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 5-6 Volt/cm<sup>2</sup> durchgeführt. Anschließend wurden die Gele unter dem UV-Licht eines Transilluminators fotografiert.

### **3.1.7 Griess-Analyse zur Ermittlung der iNOS-Aktivität**

Zur Quantifizierung des im Medium gelösten Produktes NO der iNOS, das in wässriger Lösung als stabiles Abbauprodukt Nitrit vorliegt, wurde anhand der Griess-Analyse (GREEN *et al.*, 1981) durchgeführt, wobei Nitrit als Maß für die NO-Produktion durch iNOS innerhalb des Induktionszeitraumes von 36 h zu betrachten ist.

Das Prinzip der photometrischen Methode besteht in einer Änderung des Absorptionsmaximums durch die Azokupplung zweier aromatischer Amine, wovon einer, Sulfanilamid in Gegenwart von HCl mit Nitrit diazotiert wird. Dieses Diazoniumsalz wird anschließend in einer Substitutionsreaktion mit einem zweiten farblosen Aromaten, dem Naphthylethylendiamin, "gekuppelt" (Azokupplung), wobei die entstandene Azo-Verbindung über ein ausreichend großes delokalisiertes Elektronensystem sichtbares Licht absorbiert und rot erscheint. Weil die anderen Substanzen im Überschuss zugegeben werden, ist Nitrit der begrenzende Faktor der Azofarbstoffbildung. Infolgedessen kann aus der photometrisch zu bestimmenden Konzentration der Azoverbindung bei 540 nm auf die Nitritkonzentration zurückgeschlossen werden. Zur Diazotierung wurden jeweils 300 µl Zellüberstand mit 30 µl 12,5 mM Sulfanilamid-Lösung und 30 µl 6 M HCl versetzt und 15 min bei 4 °C mit 3.500 Upm zentrifugiert. Für die Eichgerade wurde ausgehend von einer 10 mM NaNO<sub>2</sub>-Lösung

durch Verdünnung mit Wasser eine Konzentrationsreihe erstellt (0, 1, 5, 10, 15 und 20  $\mu\text{M}$   $\text{NaNO}_2$ ). Nach Überführung von jeweils 300  $\mu\text{l}$  Proben- bzw. Eichkurven-Ansätze in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte, wurde die Absorption mit dem ELISA-Reader bei 540 nm bestimmt und als Nullwert gespeichert. Zur Azokupplung wurden jedem Ansatz 25  $\mu\text{l}$  12,5 mM Naphthylethylendiamin zugesetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine erneute Absorptionsmessung bei 540 nm. Von den dabei ermittelten O.D.-Werten wurden die jeweiligen Nullwerte subtrahiert. Zur Auswertung wurden die absoluten Werte abzüglich der Nullwerte in Bezug zur Absorption bei Cytokin-Bedingungen während der Induktion (=100 %) gesetzt.

### **3.2 Spezielle Methoden zum Teil „Suche nach Inhibitoren der iNOS aus Pilzen“**

Nachfolgend sollen die Methoden erläutert werden, die speziell für die Bearbeitung der Fragestellungen dieses Teils zum Einsatz kamen.

#### **3.2.1 Wirkung der isolierten Substanzen auf Biosysteme (Zellen und Mikroorganismen)**

Die Wirkung von isolierten Reinsubstanzen auf Pro- und einfachere Eukaryoten wurde durch die Anwendung von direkten Methoden zur Determination der Empfindlichkeit bestimmter Bakterien- oder Pilzkulturen auf Agarplatten getestet.

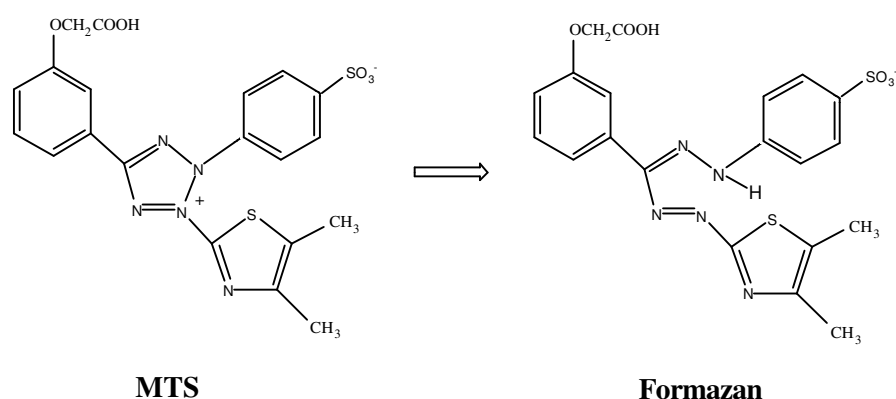
##### **3.2.1.1 Untersuchungen zur Zytotoxizität der isolierten Verbindungen**

Dazu wurden die Zelllinien in Medien gehalten, die den allgemein verwendeten entsprachen und diese dann nach dem Induktionsprotokoll normal mit Cytokinen behandelt und dann auf den Einfluss unterschiedlich konzentrierter, im Medium gelöster Verbindungen untersucht.

###### **3.2.1.1.1 MTS-Untersuchung zur Bestimmung der Proliferation von Zellen**

Die Zytotoxizität einer Reinsubstanz auf die in Kap. 3.1.2.1 aufgeführten in Promotor- und Expressionsanalysen verwendeten humanen Zelllinien wurde in einem elektronengekoppelten Nachweisverfahren in Abhängigkeit der Mitochondrienaktivität in

lebenden Zellen im photometrisches Verfahren durchgeführt (BERRIDGE *et al.*, 1993). Schon zu Beginn der achtziger Jahre wurde ein Verfahren in lebenden Zellkulturen angewendet, bei dem gelb erscheinendes MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch die Elektronenübertragung in eine dunkelbraune Formazansalz-Verbindung überführt wird, die photometrisch im Unterschied zur Ausgangsverbindung bei 490 nm absorbiert (HANSEN *et al.*, 1989). Man ging davon aus, dass die Elektronenübertragung auf die komplexe Verbindung in den Mitochondrien lebender Zellen passiert, es ist allerdings auch denkbar, dass aber auch extrazelluläre Dehydrogenase-Aktivität einen Teil der Formazan-Reduktion ausmacht (MOSMANN *et al.*, 1983). Heute wird die dem MTT verwandte Substanz MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium]-Salz) verwendet, die durch die PES (Phenazin-Ethosulfat)-vermittelte Elektronenübertragung zur Formazanverbindung überführt und ebenso bei 490 nm im photometrischen Nachweis detektiert wird. Die Zellen wurden für den Versuch in einer Dichte von ca.  $5 \times 10^4$  Zellen / Loch in einer 96-Loch-Mikrotiter-Platte in Medium mit Serum ü. N. kultiviert und am nächsten Tag mit Medium ohne FCS versetzt, sodass die Zellen bis zum nächsten Morgen in Mangelmedium inkubierten. Dem Medium wurde am nächsten Morgen für acht Stunden 5 % FCS, das Cytokin-Gemisch (100 U/ml IFN- $\gamma$ , 50 U/ml IL-1 $\beta$  und 10 ng/ml TNF- $\alpha$ ) und die Substanzen zur Testung zugegeben und parallel Kontroll-Zellen in 100  $\mu$ l Medium mit Lösungsmittel (z.B: Ethanol p.A.), mit und ohne Cytokine sowie auch zwei Löcher ohne Zellen mit 100  $\mu$ l Medium für den Leerwert gehalten.



**Abbildung 3-1:**

**Reaktion von MTS zum Formazan-Produkt durch PES-vermittelte Elektronenübertragung.**

Nach der Induktionszeit wurden die Zellen mit 20  $\mu$ l des Cell Titer 96 AQueous One-Solution-Cell-Proliferation-Agens (Cell Titer 96 Non-radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin #TB112, Promega Corp., Mannheim) versetzt. Die Farbumschlagsreaktion erfolgte für

1 h bei 37°C. Danach konnte durch Auslesen der Mikrotiterplatte der Wert für die relative Zahl lebender Zellen bei 490 nm bestimmt werden. Zur Ermittlung des Einflusses der Wirkstoffe auf das Zellwachstum als Indikator für die Zytotoxizität wurde der Leerwert abgezogen und die Absorptionswerte in Relation zum Wert für die Kontrollzellen gesetzt.

#### **3.2.1.1.2 Empirische Ermittlung der Zelldichte nach Behandlung**

Die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der isolierten Verbindungen erfolgte im Zytotoxizitätstest wie bei ZAPF *et al.* (1995) beschrieben. Die einen Zellrasen bildenden Zellen humanen Ursprungs wurden in einer feuchten Atmosphäre bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Diese Methode der Beobachtung der zytotoxischen Wirkung von Substanzen wurde nur bei HeLa-S3-Zellen im Rahmen der transienten Transfektion über eine Zeit von 48 h durchgeführt.

#### **3.2.1.2 Agardiffusionstest (Bioautographie)**

Durch die Bildung eines Hemmhofes bei Substanzeinwirkung auf das Bakterien- oder auf das Pilzwachstum wurde die antibiotische oder antifungische Wirkung der isolierten Sekundärmetaboliten untersucht. Die untersuchten Mengen der Substanzen betrugen 1 – 30 µg/Rondell und die Inkubationszeit bei 27 bzw. 37°C in Abhängigkeit von der optimalen Wuchstemperatur des jeweiligen Stammes (siehe Kap. 2.2.8) betrug 24 h. Die Hemmhöfe um die Rondelle wurden vermessen und der Durchmesser des Hemmhofes als Maß für die jeweilige Wirkung somit dokumentiert.

### **3.2.2 Kultivierung der Pilze und Fermentationsanalysen**

Für die Isolierung wirksamer Substanzen wurden für das erste Screening andere Kultivierungsmethoden verwendet wie später für die einzelnen Aufreinigungsschritte bis hin zu den Isolierungen größerer Mengen der Substanzen aus Fermentationen im großen Maßstab.

#### **3.2.2.1 Fermentation von Pilzen**

Es wurden einerseits weniger aufwendige, für Screeningverfahren ausreichende Schüttelkulturen im Erlenmeyer-Kolben angesetzt und daraus Rohextrakte für das Screening gewonnen. Andererseits wurden im größeren Maßstab Fermentationen in Großfermentern

durchgeführt, deren Kontrolle einfacher war und die eine gezielte, definierbare Gewinnung der Substanzen ermöglichten.

#### **3.2.2.1.1 Fermentation in Schüttelkultur und Herstellung von Rohextrakten**

Die beim ersten Screening (z.B. bezüglich einer GAS/ISRE-abhängigen Reportergen-Aktivität) ausgesuchten Pilze wurden von bei 4°C gelagerten Schrägröhrchen auf Festmediumplatten mit dem entsprechenden Medium überimpft. Die Platten wurden nochmals überimpft und standen dann der Inokulation von Mycelstückchen für 250 ml-Schüttelkultur im Erlenmeyer-Kolben zur Verfügung.

#### **3.2.2.1.2 Fermentation zur Aufreinigung der Sekundärstoffe aus Pilzen**

Die aus dem Promotorscreening mit GAS/ISRE-Promotorkonstrukten in HeLa-S3-Zellen positiv aufgefallenen Stämme wurden nach dem Überimpfen eines kleinen Inokulums auf Agarplatten erst in Schüttelkultur und dann im Rührfermenter kultiviert. Die Kultivierung in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 250 ml Medium erfolgte auf einer Rundsüttelmaschine bei 22°C und 120 Upm. Als Inoculum wurden mehrere Agarstücke einer gut bewachsenen Agarplatte verwendet. Die Fermentationen im Rührfermenter wurden im 20-l-Maßstab in Fermentern des Typs C6, Biolaffitte, Paris oder Biostat U, Braun, Melsungen, durchgeführt. Die Fermentation des Produzenten erfolgte gemäß des Standardverfahrens, welches von *WITTER et al.* 1998 beschrieben wurde. Die Temperatur betrug 22 °C, die Luftzufuhr 3 - 3,5 l/min und die Rührergeschwindigkeit 120 Upm. Die Fermentation im 20-l-Maßstab wurde mit einer Vorkultur von 200 ml aus dem Kolben und die Fermentation im 200-l-Maßstab mit einer Vorkultur von ca. 12 - 15 l beimpft, die aus einem gut bewachsenen 20-l-Fermenters stammte. Die Fermentation im 100-l-Maßstab erfolgte im Fermenter Biostat U, Braun, Melsungen und wurde bei 22 °C, 150 Upm und einer Luftzufuhr von 15 l/min durchgeführt. Der 100-l-Fermenter wurde mit der Kulturbrühe aus einem gut bewachsenen 20-l-Fermenter beimpft. Im Laufe der Fermentation wurde dem Fermenter täglich bzw. alle 2 Tage eine Probe von 80-100 ml entnommen. Diese wurde auf den pH-Wert, den Glucose-Gehalt und nach Trennung des Mycels vom Kulturfiltrat auf das Myceltrockengewicht hin untersucht. Diese Daten konnten dann für den gesamten Fermenter-Verlauf in einer Graphik dargestellt werden. Um den Sauerstoffverbrauch bzw. den -gehalt im Medium und den die Kohlendioxidbildung

beobachten zu können wurden die Belüftungsrate, die O<sub>2</sub>-Elektrode und die Rührergeschwindigkeit über ein Steuerelement konstant eingestellt. Außerdem wurde der Substanzgehalt des Kulturfiltrates bzw. des Mycels durch eine weitergehende Analyse der Proben in der analytischen HPLC in Methanol (nach Ethylacetat-Extraktion 100fach konzentriert) für jeden Tag der Fermentation nachgewiesen. Bei Fermentationen in Fermentern des Typs Biostat U wurden zusätzlich der O<sub>2</sub>-Verbrauch, die CO<sub>2</sub>-Produktion und der Sauerstoffpartialdruck im Medium *online* erfasst. Nach Beendigung der Fermentation wurde das Mycel mittels Filtration (Büchnertrichter oder Filterpresse) vom Kulturfiltrat getrennt. Die Wirkstoffe wurden an Adsorberharz gebunden und dann mit einem Wasser-Methanol-Aceton-Gradienten eluiert. Das Mycel wurde lyophilisiert und anschließend mit Aceton extrahiert oder verworfen. Die Lösungsmittel wurden unter Vakuum bei 40 °C entfernt und wässrige Rückstände mit Essigester extrahiert. Die getrockneten Rohextrakte wurden ausgewogen und bis zur weiteren Bearbeitung oder Screenings bei –20 °C aufbewahrt.

### **3.2.2.2 Fermentationsanalysen**

#### **3.2.2.2.1 pH-Wert**

Der pH-Wert der Kulturbrühe wurde mittels eines pH-Meters ermittelt.

#### **3.2.2.2.2 Enzymatischer Nachweis des Glucose- und Maltosegehaltes der Kulturbrühe**

Zur Ermittlung des Glucosegehaltes der Proben während der Fermentation wurden Zucker-Teststreifen verwendet. Zur Bestimmung des Glucose- und Maltosegehaltes in den Proben, die dem Fermenter im Laufe der Fermentation entnommen wurden, wurden enzymatische Nachweisverfahren verwendet. Es wurde ein Teilvolumen der entnommenen Probe bei 95°C 5 min inkubiert und anschließend nach Zugabe von NADP, ATP und sukzessive den Enzymen Hexokinase und  $\alpha$ -Glucosidase der Glucose- bzw. der Maltose-Gehalt bei einer Wellenlänge von 620 nm photometrisch bestimmt.

### **3.2.2.2.3 Ermittlung des Myceltrockengewichtes**

Das vom Kulturfiltrat getrennte Mycel wurde auf einem vorher ausgewogenen Filterpapier mindestens 6 h bei 80°C getrocknet. Vor dem Auswiegen des getrockneten Mycels wurde ein einstündiger Temperatúrausgleich im Exsikkator durchgeführt.

### **3.2.2.2.4 Abgasanalytik**

Mit Hilfe des Prozessleitsystems wurden die Stoffwechselaktivitäten der im Fermenter kultivierten Produzentenstämme aufgezeichnet und die als ASCII-Datei auszuwertenden Daten erfasst. Über ein Steuerelement wurde der O<sub>2</sub>-Partialdruck der Kulturbrühe über eine Sauerstoffelektrode und in der nachgeschalteten Abgasanalytik der Sauerstoffgehalt und der Kohlendioxidgehalt in der Abluft *on-line* erfasst.

### **3.2.2.2.5 Sekundärstoffnachweis mittels analytischer HPLC**

Kulturfiltrat- und Mycelextrakte wurden mit Einmalsterilfiltern filtriert und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Der im Extrakt enthaltene Wirkstoff wurde über eine HPLC-Analyse quantifiziert. Dabei erfolgte die Detektion des Wirkstoffes mittels UV-Spektrum und externem Standard. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierungsgerade mit Hilfe des Standards erstellt.

### **3.2.3 Analyse des Einflusses der Wirkstoffe auf die DNA-, RNA- sowie der Proteinbiosynthese in A549/8-Zellen**

Am Vortag des Versuchs wurden  $5 \cdot 10^5$  Zellen /Loch in eine 24-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät und ü. N. in Normalmedium kultiviert. Diesem Medium wurden Substanzen in bestimmten Konzentrationen zugesetzt und als Kontrolle dienten Ansätze ohne Substanzen. Anschließend wurde je 0,1 µCi (2-C<sup>14</sup>-)Thymidin, (2-C<sup>14</sup>-)Uridin oder (1-C<sup>14</sup>-)Leucin zu 1 ml der vorinkubierten Zellen/Loch gegeben und weitere 4 h 30 min bei 37°C inkubiert. Der Einbau wurde durch die Zugabe von 1 ml 10-%iger TCA gestoppt. Der säureunlösliche Niederschlag wurde über einen Zellulosenitrat-Filter abgetrennt und mit 5 %iger TCA gewaschen. Die Radioaktivitätsmessung der unter Rotlicht getrockneten Filter erfolgte in 5 ml wasserfreiem Szintillator mit einem LSC-Gerät (Flüssigkeitsszintillationszähler).

### **3.2.4 Screening von Pilzrohextrakten, von teilaufgereinigten Extrakten und von Reinsubstanzen auf deren Einfluß auf entzündungsrelevante Enzyme**

Die Analysen zum Screening der Extrakte aus Pilzen erfolgten in drei verschiedene Stufen zur Findung aktiver Substanzen. Erstens zur Selektion aktiver Rohextrakte als Primär-Screening, wobei sich die Zahl der aktiven Extrakte deutlich reduziert. Die zweite Aufreinigungsstufe erfolgt nach der Trennung der Rohextrakte über präparative chromatographische Methoden über Kieselgel oder die HPLC, wonach die jeweiligen Produkte oder Extraktfraktionen auf ihre Wirkung hin analysiert werden. Die dritte Stufe des Screenings stellt im Grunde das Ende des Screenings dar. Dort wird abschließend die durch die Stufen 1 und 2 gewonnenen Reinsubstanzen auf ihre „reine“ Aktivität in Bezug auf die untersuchten Promotoren und die Genexpression relevanter Enzyme wie die der iNOS hin überprüft werden.

#### **3.2.4.1 Screening nach Substanzen mit inhibitorischer Wirkung auf die sezernierbare alkalische Phosphatase (SEAP), deren Expression von Enhancer-Elementen (GAS/ISRE, NF- $\kappa$ B) abhängig ist**

Am Vortag der Elektroporation zur Herstellung der transient transfizierten Zellen wurden die HeLa-S3-Zellen in großen Kulturflaschen ausgesät, sodass der Zellrasen nicht mehr als 60 % konfluent war. Nach der Ablösung der Zellen durch Trypsin wurden diese bei 1.000 x g und 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet in PBS zu einer Dichte von 1-5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml resuspendiert. Danach wurden in sterile Küvetten zur Elektroporation 30 µg Plasmid-DNA (pGL3-NF $\kappa$ B oder pTK-GAS/ISRE) und 0,8 ml Zellsuspension einpipettiert. Die Elektroporation erfolgte bei 960 µF und 220 Volt Spannung. Nach dem Puls für ca. 3 Sekunden wurden die Küvetten 10 min auf Eis inkubiert und die Zeitkonstanten notiert (diese sollten bei gut verlaufenden Elektroporationen um 25 liegen; diese Angabe bezieht sich auf die proportional dazu steigenden Werte für die Leitfähigkeit der Zellmembran in µF). Der Inhalt der Küvette wurde anschließend mit 24 ml des Mediums versetzt und in die Löcher einer 24-Well-Mikrotiterplatte einpipettiert. Nach 24 h wird das Medium durch Inkubationsmedium mit den darin gelösten Testsubstanzen sowie den zur Induktion benötigten Cytokinen ersetzt. Für das NF- $\kappa$ B-Konstrukt wurde dem Medium 10 ng/ml TNF- $\alpha$  und für das GAS/ISRE-Konstrukt wurden 10 ng/ml IFN- $\gamma$  und 0,5 ng/ml IFN- $\alpha$  zur Induktion zugesetzt. Nach 48 h wurde die



SEAP-Aktivität im Medium ermittelt. Für den SEAP-Assay mussten alle Lösungen verdünnt werden und auf Raumtemperatur eingestellt sein. Zu 30 µl des Überstandes wurden 70 µl des 1 x Dilution-Buffers zugegeben und gemischt. Danach wurden die Proben bei 65°C für 15 min inkubiert und dann auf Eis gestellt. Je 30 µl des abgekühlten Überstandes wurden als Dreifach-Ansatz in je ein Loch einer Mikrotiterplatte gegeben und 100 µl des Assay-Buffers zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 µl des Reaction-Buffers zugegeben. Außerdem wurde in ein Loch 1 µl reine alkalische Phosphatase gegeben und dieses auch mit 100 µl des Reaction-Buffers versetzt.

Nach der Reaktionszeit von 20 min wurde die Platte im ELISA-Reader abgelesen und für 1 Sekunde gemessen. Die Rohdaten wurden in einem Tabellenkalkulationsprogramm in Bezug zur Aktivität der Kontrolle gesetzt und so die relative SEAP-Aktivität ermittelt.

#### **3.2.4.2 Screening nach Inhibitoren der Expression der humanen induzierbaren NO-Synthase (iNOS)**

Zur Ermittlung der spezifisch auf die iNOS-Promotor-Aktivität wirkenden Extrakte wurden Rohextrakte oder bereits teilaufgereinigte Extrakte in einer Konzentration von 100 µg/ml dem Medium mit Cytokingemisch (10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 100 U/ml INF- $\gamma$  und 50 U/ml IL-1 $\beta$ ) für induzierte A549/8-Zellen zugesetzt, die stabil mit pXP<sub>2</sub>NOS2(16)Luc transfiziert worden waren. Für dieses Screening-Verfahren wurden die getrockneten Anteile des Extraktes in einer Konzentration von 100 µg/ml in Ethanol p.A. gelöst. Je nach Aufreinigungsgrad und Potenz wurde die Konzentration auf 30 µg/ml bis 1 µg/ml in Medium für das Screening reduziert.

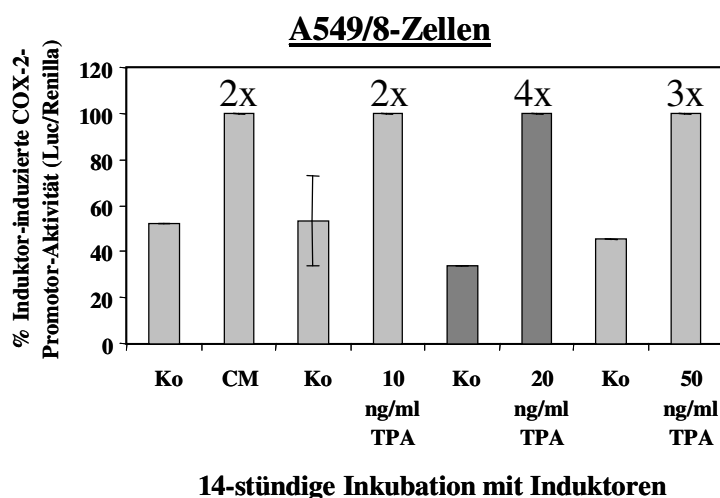
#### **3.2.4.3 Promotorstudien zur Hemmung der basalen Transkriptionsaktivität unter Verwendung von humanen ECVpG1<sub>3</sub>ecNOS(3.5)P1Luc-Zellen**

Zur Ermittlung der spezifisch auf die eNOS-Promotor-Aktivität wirkenden Extrakte wurden Rohextrakte oder bereits teilaufgereinigte Extrakte in einer Konzentration von 100 µg/ml dem Medium für ECV-Zellen zugesetzt, die stabil mit dem humanen ecNOS-Promotor (3.5kb) transfiziert worden waren. Für das Screening wurde die gleiche Wirkstoffmenge im Extrakt wie bereits in Kap. 3.2.4.2 beschrieben verwendet.

### 3.2.4.4 Studien zur Hemmung des 1.4 kb-humanen COX-2-Promotors in humanen A549/8-Zellen und Einstellung der Induktionsbedingungen

Zur Ermittlung der zusätzlich auf die COX-2-Promotor-Aktivität wirkenden Extrakte wurden Rohextrakte oder bereits teilaufgereinigte Extrakte in einer Konzentration von 100 µg/ml oder auch die Reinsubstanzen dem Medium mit Cytokin-Gemisch für A549/8-Zellen zugesetzt, die transient mit einem COX-2-Promotor (1.4 kb) transfiziert worden waren (siehe Kap. 2.1.6.1). Vor Beginn des Screenings wurden noch die optimalen Induktionsbedingungen ermittelt, d. h. die optimale Induktionsdauer in A549/8-Zellen und die minimale TPA-Konzentration, die nötig war, um noch eine maximale Induktion der Luziferase-Expression zu erhalten. Als optimaler Reportervektor wurde pGl<sub>3</sub>hCOX2(1.4)Luc verwendet, der nach 14stündiger Induktion mit 20 ng/ml TPA 4-fach induzierbar gemessen an der Luziferase-Aktivität (Luziferase-Einheiten / Renilla-Einheiten) war. Außerdem sollte die Zelldichte pro Loch 24 h vor Versuchsbeginn nicht mehr als  $3 \cdot 10^4$  Zellen betragen, um dann gute Induktionsraten erreichen zu können. Aus der Abbildung 3-2 konnten die Testbedingungen für das Screening abgeleitet werden. Die höchste Induktionsrate von 4-fach (20 ng/ml TPA) gegenüber der unbehandelten Kontrolle konnte erst nach 14-stündiger Induktion festgestellt werden. Nach 6 h ergab sich eine noch wesentlich niedrigere Induktionsrate für die transiente Transfektion mit dem COX-2-Promotor-Konstrukt.

Für das Screening wurde die gleiche Wirkstoffmenge im Extrakt wie bereits in 3.2.4.2 beschrieben verwendet.



**Abbildung 3-2: Optimierung der Induktionsbedingungen und -zeiten für A549/8-Zellen transient co-transfiziert mit pGl<sub>3</sub>hCOX2(1.4)Luc und pRenilla.**

TPA (PMA): Phorbol-12-Myristat-13-Acetat-Behandlung; CM: Cytokin-Gemisch; Ko: Kontrollzellen ohne TPA oder CM.

### **3.2.5 Methoden zur Reinigung und physikalisch-chemischen Charakterisierung der Sekundärstoffe**

#### **3.2.5.1 Säulenchromatographie**

Die Auftrennung von Rohextrakten wurde mittels Kieselgel-60-Chromatographie durchgeführt und die Säule mit einem Cyclohexan-Ethylacetat-Gradienten (vgl. Tabelle 3-3) eluiert. Diese wurde unter Normaldruck durchgeführt und zur Elution wurde Methanol verwendet.

Zur Elution von getrockneten Fermenter-Rohextrakten wurde je nach Säulenbefüllungshöhe (1g Festsubstanz / 50 g Kieselgel-60) das Elutionsvolumen pro Gradienten-Schritt variiert.

<b>Gradienten - Schritt</b>	<b>Eluent 1 (Cyclohexan) in %</b>	<b>Eluent 2 (Essigsäureethylester) in %</b>	<b>Eluent 3 (Methanol) in %</b>	<b>Elutionsvolumen des Gemisches in l</b>
1	100	0	0	0,2-0,3
2	70	30	0	0,2-0,3
3	50	50	0	0,2-0,3
4	30	70	0	0,2-0,3
5	20	80	0	0,2-0,3
6	10	90	0	0,2-0,3
7	0	100	0	0,2-0,3
8	0	0	100	0,3

*Tabelle 3-3: Lösungsmittel-Gradient zur Elution von Fermenter-Rohextrakten.*

#### **3.2.5.2 Dünnschichtchromatographie**

Vor der Auftragung von Proben auf die präparative HPLC wurde das Laufverhalten in unterschiedlichen Materialien mittels HPTLC-Platten überprüft, wobei auch unterschiedliche Lösungsmittelsysteme berücksichtigt wurden. Außerdem wurden die Proben vor ihrer Auftragung auf die HPLC über Einmalsterilfilter filtriert. Die Fraktionen aus einer Kieselgel 60-Säulenpräparation wurden mittels Kieselgel-60-Platten chromatographisch dargestellt und

ggf. ähnlich zusammengesetzte Fraktionen vereinigt.

### 3.2.5.3 HPLC-Analyse

Durch eine HPLC-Analyse wurde die isolierten Substanzen in punkto ihrer Retentionszeiten im definierten Gradientensystem charakterisiert und auch die quantitative Analyse von Rohextrakten aus Fermenter-Proben erfolgte über diese Methode. Die Reinsubstanzen wurden in definierter Menge analysiert während die Kulturfiltrat- und Mycelextrakte 1:100 in Methanol aufgetragen wurden, um die Menge der Substanz im Laufe einer Fermentation nachweisen zu können.

Zur qualitativen und quantitativen Analyse standen folgende HPLC-Systeme zur Verfügung:

1. Jasco PU-980 mit Multiwellenlängen-Detektor MD-910 (Jasco, Groß-Umstadt)
2. Shimadzu SCL-10AVP (System Controller) mit SPD-M10AVP (DAD) und LC-8A (Pumpe) (Shimadzu, Darmstadt)

Beide HPLC-Geräte waren mit einer RP18-Säule ausgestattet. Es wurde ein 25 min dauernder Acetonitril-H<sub>2</sub>O-Gradient angewendet, der bei 24°C und mit einem Probeneinspritzvolumen von 10 bis 25 µl durchgeführt wurde. In Tabelle 3-4 ist der für die analytische HPLC verwendete Gradient aufgeführt.

Die an die HPLC gekoppelte Massenspektroskopie arbeitete mit „Atmospheric Pressure Chemical Ionization“ (APCI) mit positiver und negativer Polarität der Dynode. Die Analyse erfolgte bei einer Temperatur von 400°C und die Nadelspannung betrug 4000 V bei einem Stromfluß von 4 µA.

Säulenmaterial	Flussrate (ml/min)	Zeitpunkt (min)	Acetonitril (%)	H <sub>2</sub> O (%)
RP18	1,5	0	0	100
		20	100	0
		22	100	0
		25	0	100

**Tabelle 3-4: HPLC-Gradient zur qualitativen sowie zur quantitativen Analyse.**  
Analysiert wurden Rohextrakte, teilaufgereinigte Extrakte sowie Reinsubstanzen.

Für die Quantifizierung wurde eine Kalibrierungsgerade mit Hilfe von Standardlösungen (z. B. der Reinsubstanz) als externer Standard erstellt.

#### **3.2.5.4 UV/Vis- und IR-Spektroskopie**

Zur physikalisch-chemischen Charakterisierung der isolierten Substanzen wurden UV/Vis-Spektren in Methanol zwischen 210 nm und 400 nm mit einer Küvette von 1 cm Schichtdicke (UV/Vis-Spektrometer, Lambda 20, Fa. Perkin Elmer, Langen) und IR-Spektren zwischen  $400\text{ cm}^{-1}$  und  $4000\text{ cm}^{-1}$  (FT-IR Spektrometer, Spektrum One B, Fa. Perkin Elmer, Langen) in Kaliumbromid (KBr) aufgenommen.

#### **3.2.5.5 Massenspektroskopie**

Massenspektren der Wirkstoffe wurden direkt mit Hilfe des Direkteinlasses des verwendeten Massenspektrometers (Finnigan Polaris/GCQ<sup>Plus</sup>, Fa. ThermoQuest, Egelsbach) ermittelt. Hierbei wurden 1-10 ng der Probe gelöst in 1 µl Methanol auf das Glühfilament der Probenschubstange aufgetragen. Nach dem Verdunsten des Lösungsmittels wurde die Probenschubstange über eine Vakuumschleuse in die Ionisierungskammer (Temperatur der Kammer: 200 °C) des Massenspektrometers eingeführt. Anschließend wurde die Probe auf dem Glühfilament durch Anlegen einer konstanten Spannung und Steigerung des Stromes von 0 auf 1000 mA (Rate: 25 mA/Sekunde) in der Ionisierungskammer verdampft. Als Ionisierungsmethode wurde bei allen Proben „elektronische Ionisierung“ (EI) verwendet. Außerdem konnte mittels des Spektrometers zum Abgleich ein HPLC-Durchgang gefahren werden.

#### **3.2.5.6 NMR-Spektroskopie und Strukturaufklärung**

Die NMR-Spektroskopie im Rahmen der Strukturaufklärung erfolgte durch *Prof. O. Sterner* (Universität Lund, Schweden).

### **3.2.6 Nachweis des Einflusses der isolierten Wirkstoffe auf die JAK2-STAT-1 $\alpha$ -Signaltransduktion durch die Gelretentionsanalyse**

#### **3.2.6.1 Isolierung von Kern-Protein zur Verifikation der Transkriptionsfaktor-Bindung an regulative Promotor-Konsensus-Sequenzen**

Die Zellen wurden zur Bestimmung der Bindung von Signal-Proteinen wie STAT-1 $\alpha$  an spezifische Konsensus-Oligonukleotide, die als Maß die darauffolgende Aktivierung des regulierten Gens durch diesen Faktor gelten kann, nach Vorbehandlung in Mangelmedium mit oder ohne Substanzen 3 Stunden mit einem Cytokin-Gemisch (100 U/ml IFN- $\gamma$ , 50 U/ml IL-1 $\beta$  und 20 ng/ml TNF- $\alpha$ ) induziert. Dem für die Zellen verwendeten Mangelmedium wurden 2 h vorher die zu testenden Verbindungen aus Pilzen in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Die Isolierung des Kernproteins erfolgte nach der Methode von *OSBORN et al. (1989)*. Nach dem die Zellen induziert worden waren, wurden diese mit 1 ml eiskaltem PBS von der Platte gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 4°C mit 2.000 Upm zentrifugiert. Die so pelletierten Zellen wurden in Protein-Lyse-Puffer resuspendiert und nach 5 Minuten Inkubation auf Eis für 5 min bei 2.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als zytoplasmatische Fraktion bei -80°C eingefroren. Das pelletierte nukleäre Protein wurde noch einmal in Protein-Lyse-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand mit den Resten an zytosolischem Protein wurde verworfen und das nukleäre Protein-Pellet in 200  $\mu$ l Kernprotein-Puffer resuspendiert und bei -80°C eingelagert.

#### **3.2.6.2 Konzentrationsbestimmung für Kernproteine (Bicinchonic-Acid-Assay)**

Mittels eines Bicinchonic-Acid-Assay-Systems wurde der Gehalt einer Lösung an Protein nach der Biuret-Methode bestimmt, wenn die Lösung größere Mengen an NP-40 oder TritonX-100 wie bei Gesamtprotein- und zytosolischen Protein-Aufreinigungen enthielt. Es wurde eine Eichreihe mit definierten Proteinmengen von 0 bis 1 mg/ml BSA hergestellt und die Proben in einem definierten Volumen in je ein Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte aufgebracht. 10  $\mu$ l der Eichkurven-Lösungen wurden in die oberen Lochreihen der Mikrotiterplatten pipettiert und jeweils ein Proben-Volumen des Puffers zupipettiert, in dem die Proteine lysiert wurden. Dieses Volumen wurde nun auch den Proben als Wasser zupipettiert. Zu jedem der Löcher wurden nun 200  $\mu$ l von jeweils 1 Volumen 4%-CuSO<sub>4</sub>-Lö-

sung und 40 Volumen BCA-Lösung zugegeben.

Nach 30 min bei 37°C zur Ausbildung des Cu<sup>+</sup>-BCA-BCA-Komplexes wurde die Platte auf einem Platten-Reader bei 540 nm gemessen. Die Werte wurden nun durch den Faktor 10 geteilt, um auf die realen Werte zu kommen.

### **3.2.6.3 Gelretentions-Analyse**

Zur Analyse der Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren nach Inkubation mit inhibierenden oder stimulierenden Agenzien wurde die Gelretentionsanalyse angewandt.

Dafür wurden Kernextrakte aus DLD-1- und A549/8-Zellen nach der Methode von *Osborn et al.* präpariert und 10 µg des Kernextraktes mit 17,5 fmol der radioaktiv markierten Oligonukleotide inkubiert. Diese Inkubation erfolgte in 1 x DNA-Bindepuffer und wurde nach und wurde nach 20 min durch Zugabe von 2 µl 1x Gelretentions-Ladepuffer abgestoppt. Die Protein-DNA-Komplexe wurden direkt danach in nativen 4 % Polyacrylamid-Gelen (1x Gelretentions-Laufpuffer) bei 4°C aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei etwa 200 V und konstant 23 mA pro Gel, bis die Bromphenolblau-marker-Bande ca. 4 cm vom Gelunterrand entfernt war. Nach dem Trocknen erfolgte die Autoradiographie bzw. die Phosphor-Imager-Auswertung. Zur Überprüfung der Bindungsspezifität erfolgte eine Kompetition der Komplexbildung mittels Zugabe von 1.75 pmol (100-facher Überschuss) nicht radioaktiv markierter Oligonukleotide zu radioaktiv markiertem Oligonukleotid und bindungsaktiven Extrakten.

### **3.3 Spezielle Methoden zur „Untersuchung des Einflusses der kleinen G-Proteine auf die iNOS-Expression“**

#### **3.3.1 Alkalische Hydrolyse von Lovastatin und Mevalonat zur Aktivierung des Laktonringes**

##### **3.3.2.1 Alkalische Hydrolyse von Lovastatin (KITA *et al.*, 1980)**

Für 1 ml einer 30 mM Lovastatin-Lösung wurden 12,14 mg Lovastatin (Laktonform) in 80 µl 55 °C warmem Ethanol (absolut) gelöst und dann mit 80 µl 0,6 N NaOH versetzt. Nach Zusatz von 600 µl *Aqua bidest.* und kräftigem Mischen wurde die Lösung 30 min bei RT inkubiert und dann auf Eis (4 °C) gestellt. Schließlich wurde die Lösung mit Hilfe von HCl neutralisiert (pH 7-8) und mit *Aqua bidest.* auf das Endvolumen von 1 ml aufgefüllt. Als Lösungsmittelkontrolle kam eine in gleicher Weise bereitete Lösung zum Einsatz, der kein Lovastatin zugesetzt worden war.

##### **3.3.1.2 Alkalische Hydrolyse von Mevalonat (ESSIG *et al.*, 1998)**

Für 1 ml 100 mM Mevalonat-Lösung wurden 13,01 mg Mevalonat (Laktonform) in etwas weniger als 1 ml 0,1 N NaOH gelöst und für 2 h bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Lösung unter Zusatz von HCl neutralisiert (pH 7-8) und mit *Aqua bidest.* auf 1 ml aufgefüllt. Als Lösungsmittelkontrolle kam eine in gleicher Weise bereitete Lösung zum Einsatz, der kein Mevalonat zugesetzt worden war.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Isolierung aktiver, auf die Expression der humanen iNOS hemmend wirkende Substanzen aus Pilzen und deren Strukturanalyse

#### 4.1.1 Assay-Systeme zur Suche nach transkriptionellen Inhibitoren der iNOS

Mit einem Auswahl-Screening-Verfahren unter Verwendung der von *Prof. Dr. T. Anke* und *Prof. Dr. H. Anke* aufgebauten Pilz-Stammsammlung sollten Inhibitoren am Entzündungsgeschehen beteiligter Enzyme induzierbare NO-Synthase und Cyclooxygenase-2 isoliert werden. Die Struktur der einzelnen Inhibitoren sollte ebenso aufgeklärt werden wie ihre Wirkweise. Zunächst wurde ein Screening-System etabliert. Als humanspezifisches Zellmodell wurde die Lungen-Alveolarkarzinom-Zelllinie A549/8 eingesetzt, da diese Zelllinie alle Komponenten des humanen IFN- $\gamma$ -abhängigen JAK-STAT-Signaltransduktionsweges exprimiert, welcher von zentraler Bedeutung für die Aktivierung der induzierbaren Enzyme wie die der iNOS ist. Verwendet wurden Reportergenvektoren, die von *PD Dr. H. Kleinert* zur Verfügung gestellt und in humane Zellen transfiziert worden waren, z. B. ein Reporterkonstrukt, das mehrere GAS-Bindungsstellen vor Luziferase enthielt (pGASLuc, Stratagene). Dieses wurde wie auch der humane 16kb-iNOS-Promotor vor Luziferase von der Arbeitsgruppe um *PD Dr. H. Kleinert* stabil in A549/8-Zellen transfiziert, wobei als Selektionsmarker Neomycin/G-418 im Vektor pRcCMV (Invitrogen) co-transfiziert wurde. Deren jeweilige Cytokin-abhängige Induktionsrate wurde mittels Reporter-Analysen und Luziferase-Messung von den Testreihen bestimmt.

Die Reportergen-Analysen zur Determinierung der Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurden durch die Arbeitsgruppe um *PD Dr. G. Erkel* ermöglicht, die mir die Reportervektoren freundlicherweise zur Verfügung stellte. Als Reportergen wurde dort die Sekretierbare Alkalische Phosphatase (SEAP) verwendet. Als Ausgangsvektor fand der Vektor pGl<sub>3</sub>/SEAP Verwendung. In pGl<sub>3</sub>/NF- $\kappa$ BSEAP liegen fünf konkatemerische Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B oberhalb des SEAP-Gens. Durch Modifikation einer Methode für die Elektroporation von Jurkat-Zellen (LOPEZ-CABRERA *et al.*, 1993) gelang es der Arbeitsgruppe um *PD Dr. G. Erkel*, auch HeLa-S3-Zellen reproduzierbar transient zu transfizieren (Kap. 3.2.4.1) und Induktionsraten von 5- bis 10-fach über der basalen Reportergenaktivität zu erreichen.

#### **4.1.2 Suche nach Inhibitoren entzündungsrelevanter Enzyme über Assay-Systeme**

Aus der Gesamtheit aller gesammelten Pilzextrakte fielen ca. 60 bereits in Vortests mittels eines Assay-Systems (Durchführung *M. Saul*, Arbeitsgruppe *PD Dr. G. Erkel*) zum Nachweis der Hemmung der GAS/ISRE-abhängigen Signaltransduktion (pTKGAS/ISRE) in HeLa-S3-Zellen auf. Diese wurden auf eine Hemmung der Promotoren der iNOS und eNOS in humanen Zelllinien hin untersucht und weiter selektiert. Um die Wirkung auf das entzündungsrelevante Enzym iNOS in den GAS/ISRE-positiv getesteten Rohextrakten nachweisen zu können, wurde die stabile Zelllinie A549/8pNOS2(16)Luc verwendet. Nach diesem für die iNOS-Aktivität selektiven Screening waren 14 Extrakte noch in der Lage, die IFN- $\gamma$ -abhängige iNOS-Promotor-Aktivierung zu hemmen. Die restlichen Extrakte zeigten nur noch schwache oder gar keine inhibitorische Wirkung auf den in A549/8-Zellen durch ein Cytokingemisch (mit 100 U/ml IFN- $\gamma$ , 50 U/ml IL-1 $\beta$  und 10 ng/ml TNF- $\alpha$ ) 2- bis 10-fach induzierbaren iNOS-Promotor (GELLER *et al.*, 1996). Zur Bestätigung, dass die Rohextrakte nicht nur die basale Transkriptionsmaschinerie hemmten und dadurch unspezifisch auch die Inhibition der Induktion des iNOS-Promotors bewirkten, wurden diese über einen stabil transfizierten eNOS-Promotor im ECV-Zellsystem überprüft, wie in Kap. 3.2.4.3 beschrieben. Die im Test positiv sollte im besten Fall den IFN- $\gamma$ -abhängigen JAK2-STAT-1 $\alpha$ -Signaltransduktionsweg (über GAS/ISRE) hemmen, keine Wirkung auf ein nicht über Induktion aktivierbares Promotorsystem (eNOS) und eine inhibitorische Wirkung auf den iNOS-Promotor zeigen. Die Pilzstämme, von welchen diese Extrakte stammten, wurden nun gemäß Kap. 3.2.2.1.1 im 2-l-Maßstab fermentiert und das Kulturfiltrat mit Ethylacetat 1:1 extrahiert. Aus dem Pool der während der letzten Selektion identifizierten Pilzstämme wurden sechs im 20-l-Maßstab (nach WITTER *et al.*, 1998) fermentiert und eine erste präparative chromatographische Trennung der erhaltenen Rohextrakte über eine Kieselgel-Säule durchgeführt. Die Rohextrakte von drei der sechs fermentierten Pilze besaßen noch inhibitorische Aktivität. Es zeigte sich, dass sich die Aktivität bei drei der Rohextrakte wohl lediglich aus synergistischen und nicht Substanz-spezifischen Effekten zusammensetzte.

#### **4.1.3 Isolierung von transkriptionellen Inhibitoren des entzündungsrelevanten Enzyms iNOS**

Durch das gezielte selektive Screening nach inhibitorischen Substanzen in der Gesamtheit eines Fermenter-Rohextraktes wurden negativ regulatorisch wirkende Rohextrakte über im Abschnitt 3.2.5 beschriebene Verfahren zu mehreren Fraktionen aufgetrennt, die dann unterschiedlich ausgeprägte Wirkungen auf die Reporter-gen-Systeme hatten. Am Ende des nach jedem Auftrennungsschritt erneut auf Aktivität hin überprüften Extraktes stand eine aufgereinigte Verbindung, die durch *Prof. Dr. O. Sterner* (Universität Lund, Schweden) auf ihre Struktur hin analysiert wurde.

##### **4.1.3.1 Sporogen-A01 aus *Penicillium citrinum* (Stamm 48-93)**

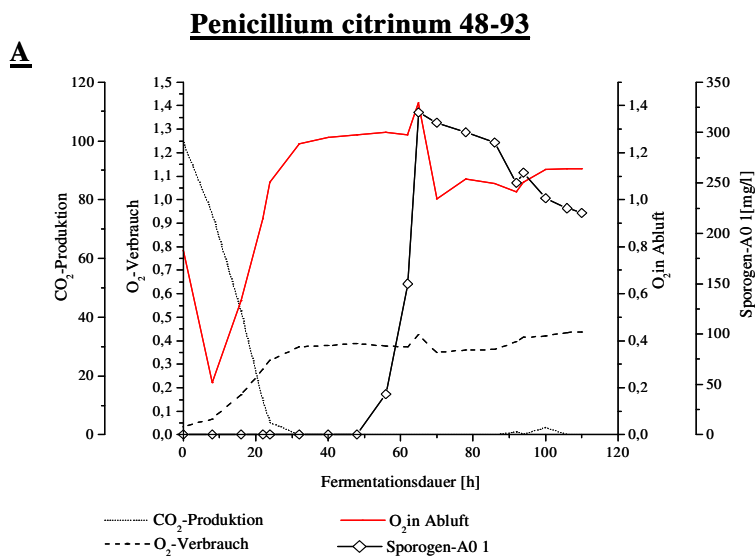
###### **4.1.3.1.1 *Penicillium citrinum* (48-93)**

Der vorliegende Stamm wurde von Frau *Prof. Dr. H. Anke* 1993 gefunden und als Infektion des Ascomyceten-Stammes A9-93 in Kultur genommen. Auf Festmedien bildet der Stamm als Pilz der Gattung *Penicillium* einen charakteristischen grünlich verfärbten Teppich.

###### **4.1.3.1.2 Fermentation von 48-93**

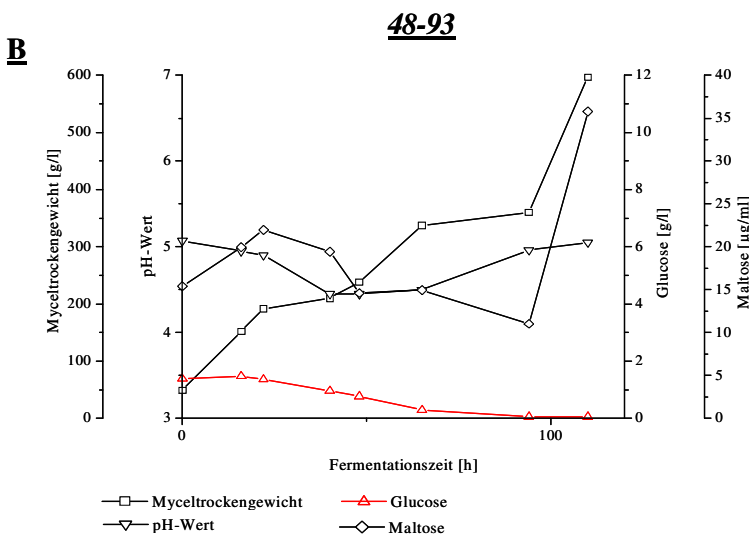
Die Fermentationen von 48-93 wurden im Medium M3 bei 22 °C durchgeführt. Abbildung 4-1 zeigt einen Fermentationsverlauf im 20-l-Maßstab. Bei dieser Fermentation wurde anstatt des Glucose-reichen Mediums (M2) zur Kultivierung das Medium M3 eingesetzt, welches durch den hohen Malzanteil zu einer deutlichen Steigerung der Sporogen-A01-Produktion führte. Mittels einer analytischen HPLC wurde auf einer RP-18 Säule durch Elution mittels eines Lösungsmittelgradienten (siehe Kap. 3.2.5.3, Tabelle 3-4) die Retentionszeit der Reinsubstanz festgestellt und so konnte die Anreicherung der Verbindung im Laufe der Fermentation dokumentiert werden. Auffallend ist das schnelle Wachstum des Pilzes. Die Produktion von Sporogen-A01 lief nicht parallel mit dem Wachstum des Pilzes, sondern setzte erst nach 50 Stunden ein und dauerte 15 Stunden. Danach war keine weitere Zunahme des Sporogen-A01-

Gehaltes zu verzeichnen. Während der Gesamt-Fermentationsdauer von 110 h (4,5 Tage) erreichte der Pilz nicht die Absterbephase. Da die Sporogen-A01-Menge in der Kulturbühe mit einem Maximalwert nach 60 h jedoch deutlich abnahm, wurde die Fermentation gestoppt und die Substanz isoliert. Unten gezeigt ist der Sporogen-A01-Gehalt im Laufe der Fermentationsdauer im Vergleich zu O<sub>2</sub>-Verbrauch und CO<sub>2</sub>-Bildung. Zu Beginn der Fermentation sinkt der pH-Wert zunächst auf ca. 4,5, dann erhöht er sich wieder. Die Fermentation lief sehr schnell ab und der höchste Gehalt an Sporogen-A01 wurde nach 60 h mit ca. 9,5 mg/l erreicht (siehe Abb. 4-1 (A)).



**Abbildung 4-1:**  
**Fermentationsverlauf von 48-93.**  
Fermentationsverlauf von 48-93 im 20-l-batch-Fermentationsverfahren unter 3 l/min Luftzufuhr (Medium M3, 22°C).

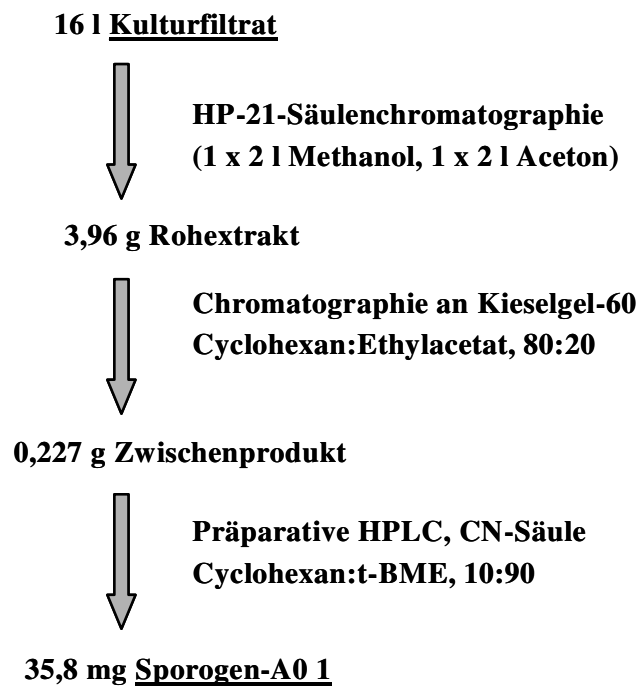
**A:** Entwicklung der O<sub>2</sub>-Verbrauchs und der CO<sub>2</sub>-Produktion im zeitlichen Vergleich mit der Sporogen-A01-Bildung im Medium.



**B:** Entwicklung der Biomassenbildung, des pH-Wertes im zeitlichen Vergleich mit dem Zuckerumsatz im Medium.

#### 4.1.3.1.3 Isolierung von Sporogen-A0 1 aus 48-93

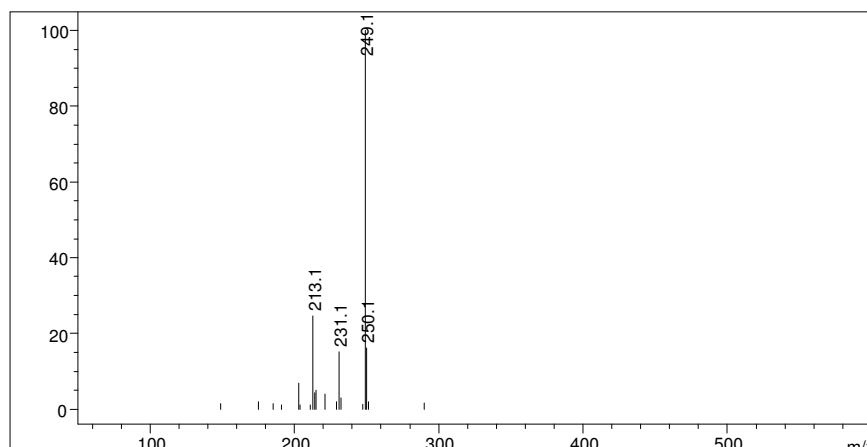
Nach Beenden der Fermentation wurde die Kulturbrühe durch Filtration vom Mycel getrennt. Aus 16 l Kulturfiltrat wurden 35,8 mg Sporogen-A01 isoliert. In Abbildung 4-2 ist das Aufreinigungsschema von Sporogen-A01 aus dem Kulturfiltrat dargestellt.



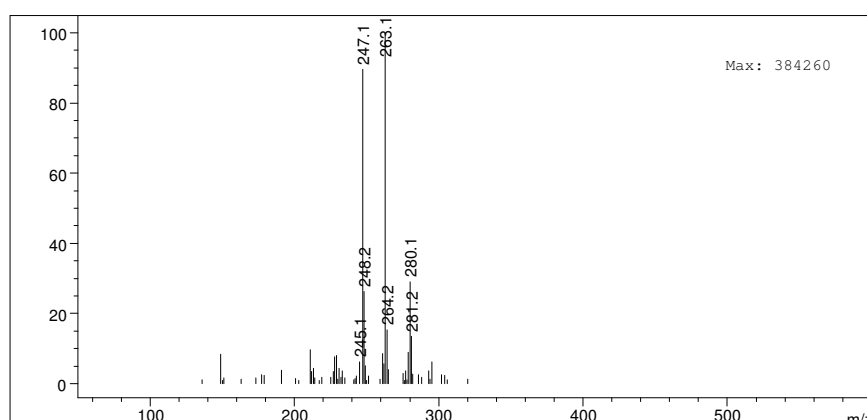
**Abbildung 4-2:**  
*Aufreinigungsschema für Sporogen-A01. Die Daten wurden nach der 20-l-batch-Fermentation von 48-93 in Medium M3 bei 22°C aus der Aufreinigung des Kulturfiltrats gewonnen.*

#### 4.1.3.1.4 Physikalisch-chemische Charakterisierung und Strukturaufklärung von Sporogen-A0 1

Sporogen-A01 wurde bereits 1984 von TANAKA *et al.* beschrieben, jedoch wurde die Charakterisierung nur unvollständig durchgeführt, so dass später mit der Substanz arbeitende Wissenschaftler wie SCHNEIDER (aus *Original-Dissertation*, 1995) dies vertieften und Sporogen-A01 als eine die Thrombozyten-Aggregation hemmende, leicht zytotoxische Substanz beschrieben. Unabhängig davon wurden physikalisch-chemische Daten zu Sporogen-A01 erhoben, die mit denen von SCHNEIDER deckungsgleich oder eine Ergänzung dazu darstellten.



**A:** APCI (positive Polarisation). Die LC-MS wurde mit Fragmentor-Spannung von 70 V und einer Verdampfer-Temperatur von 400 °C durchgeführt.



**B:** APCI (negative Polarisation). Die LC-MS wurde mit Fragmentor-Spannung von 70 V und einer Verdampfer-Temperatur von 400 °C durchgeführt.

**Abbildung 4-3: LC-MS-Spektren von Sporogen-A01 (1 mg Sporogen-A01 / ml MeOH).**

Sporogen-A01 erschien nach Trocknen als weißlicher Niederschlag und löste sich gut in polaren Lösungsmitteln (Methanol, Ethylacetat, Acetonitril, *tert*-Butylmethylether (*t*-BME) und Wasser) gut und ließ sich in unpolaren Lösungsmitteln wie Cyclohexan kaum lösen. In der Kieselgel-C60-Dünnschichtchromatographie (Gradient mit Toluol:Aceton:Essigsäure von 70:30:1) hatte Sporogen-A01 einen  $R_f$ -Wert von 0,346 aufzuweisen. Mit Hilfe der Massenspektren (Tabelle 4-1, Abbildung 4-3) konnte zunächst das Molekulargewicht, 248 Da, und dann die Summenformel,  $C_{14}H_{18}O_4$  ermittelt werden. Die Strukturaufklärung erfolgte mittels zweidimensionaler homo- und heteronuklearer NMR-Spektroskopie ( $^1H$  und  $^{13}C$ ) durch Prof. O. Sterner. In Abbildung 4-5 ist die Strukturformel der Substanz dargestellt.

APCI (+)		APCI (-)	
m/z	Intensität [%]	m/z	Intensität [%]
250,1	17	295,2	6
249,1 (M+H) <sup>+</sup>	100	281,2	13
231,1	27	280,1	29
229,1	7	279,1	9
227,1	5	264,2	15
221,1	5	263,1	100
215,1	9	248,2	26
213,1	56	247,1 (M-H) <sup>-</sup>	90

Tabelle 4-1: Relative Häufigkeit der Peaks in den Massenspektren von Sporogen-A01.

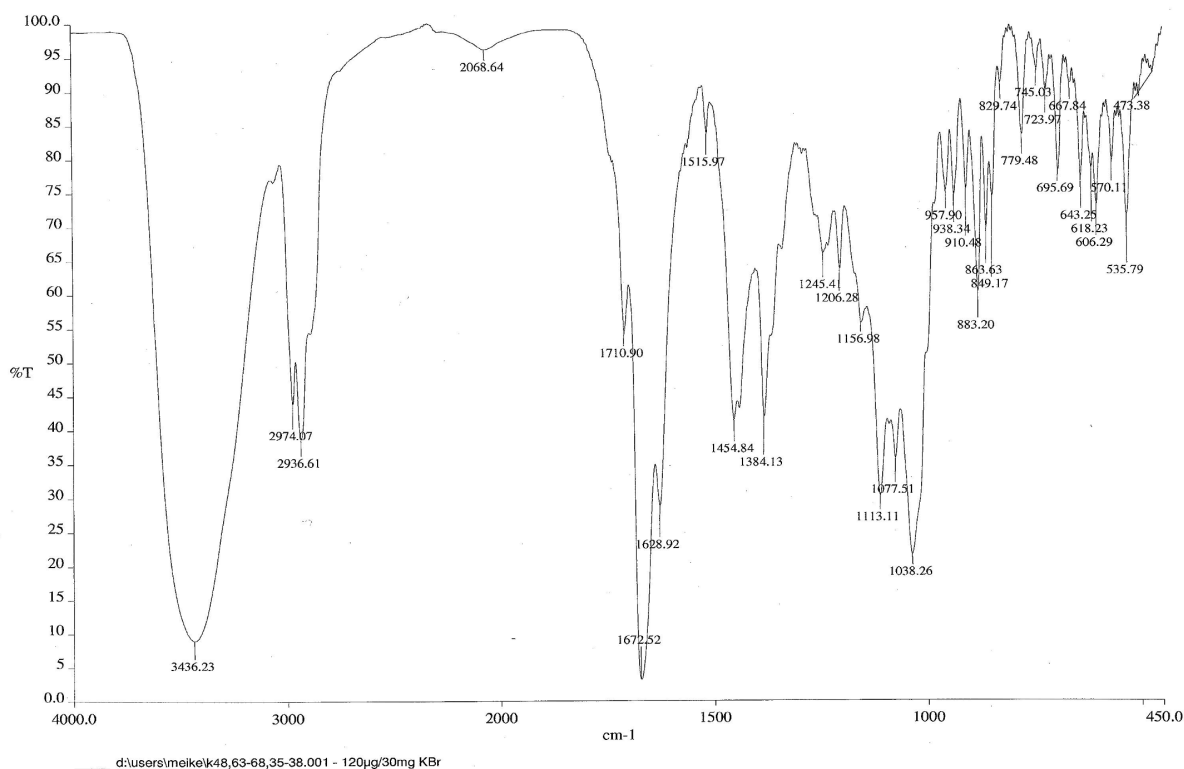


Abbildung 4-4: IR-Spektrum von Sporogen-A01 (120 µg Sporogen-A01 / 30 mg KBr).

Die Retentionszeit in einem Wasser-Acetonitril-Gradienten wie beschrieben in Kap. 3.2.5.3 (Tabelle 3-4) für die analytische HPLC mit RP-18-Säulen betrug für Sporogen-A01 8,6 min.

In der UV-Spektroskopie liegt das Absorptionsmaximum bei 241 nm (Abbildung 4-4).

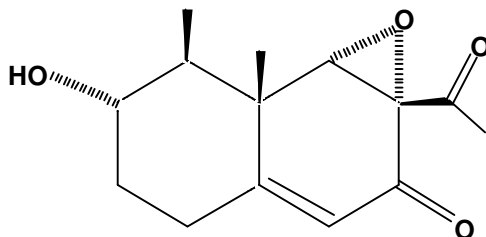


Abbildung 4-5: Struktur von Sporogen-A01.

#### 4.1.3.2 S-Curvularin aus dem Stamm *Penicillium spec 9-93*

##### 4.1.3.2.1 Produzentenstamm 9-93

Der vorliegende Stamm wurde als Infektion von einer Pflanze gesammelt und in Kultur genommen. Auf Festmedien bildet der imperfekte Pilz einen pulvrigen dunkelbraunen Teppich.

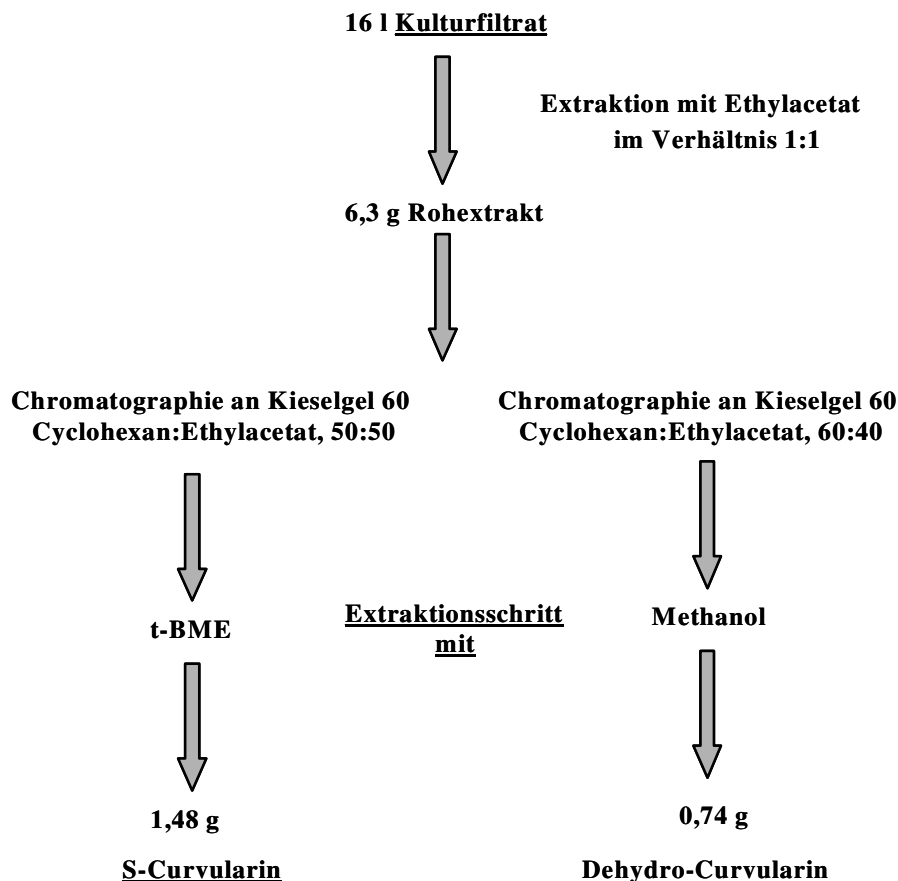
##### 4.1.3.2.2 Fermentation von 9-93

Die Fermentationen von 9-93 wurden im Medium M3 bei 22 °C durch *M. Saul* realisiert. Die Produktion von S-Curvularin lief nicht parallel mit dem Wachstum des Pilzes und hatte sein Maximum nach 22 Tagen. Danach war keine weitere Steigerung des Gehaltes an S-Curvularin in der Kulturbrühe zu verzeichnen. Während der Gesamt-Fermentationsdauer von 35 Tagen erreichte der Pilz nicht die Absterbephase. Nach 12,5 min Retentionszeit war S-Curvularin in der analytischen HPLC (RP-18) (siehe Gradient Tabelle 3-4) detektierbar, während das strukturell ähnliche, aber jedoch stets in den im GAS/ISRE-Screening weniger aktiven Fraktionen vorkommende Dehydro-Curvularin bei 11,3 min Retentionszeit eluiert wird und so vom aktiveren S-Curvularin unterscheidbar war.



#### 4.1.3.2.3 Isolierung von S-Curvularin aus Stamm 9-93

Nach Beenden der Fermentation wurde die Kulturbrohe durch Filtration vom Mycel getrennt. Aus 16 l Kulturfiltrat wurden 1,45 g S-Curvularin isoliert. In Abbildung 4-6 ist das Aufreinigungsschema von S-Curvularin aus dem Kulturfiltrat, wie von *M. Saul* durchgeföhrt, dargestellt.



**Abbildung 4-6:**  
**Aufreinigungsschema von S-Curvularin.** Die 20-l-batch-Fermentation von *Penicillium spec* 9-93 erfolgte in Medium M3 bei 22°C und danach wurde der Rohextrakt laut Schema aufgereinigt (Durchföhrtung *M. Saul*).

#### 4.1.3.2.4 Physikalisch-chemische Charakterisierung und Strukturaufklärung von S-Curvularin

S-Curvularin (2H-3-Benzoxacyclododecin-2,10(1H)-dion,4,5,6,7,8,9-hexahydro-11,13-dihydroxy-4-methyl-,(S)-(9CI)) wurde bereits 1976 als für HeLa-S3-Zellen toxische, dem Östro-gen strukturell ähnliche Substanz beschrieben. Es wurde aus *Penicillium baradicum Baghdadadi*

(NRRL 3754) als Sekundärmetabolit isoliert und fiel durch seine Ähnlichkeit mit Zearalenon, einem potenten Östrogen, auf (VESONDER *et al.*, 1976). Leider lagen bis *dato* nur teils vollständige physikalisch-chemische Daten zu S-Curvularin vor, so dass eine grundlegende Charakterisierung notwendig war. S-Curvularin erschien nach dem Trocknen als weißlicher Niederschlag und ließ sich gut in polaren Lösungsmitteln (Methanol, Ethylacetat, Acetonitril, Methanol und Wasser) und in unpolaren Lösungsmitteln wie Cyclohexan kaum lösen. In der Kieselgel-C60-Dünnschichtchromatographie (Gradient mit Toluol: Aceton: Essigsäure von 70:30:1) hatte S-Curvularin einen  $R_f$ -Wert von 0,311 aufzuweisen. Mit Hilfe der Massenspektroskopie, die von *M. Saul* durchgeführt wurde, konnte zunächst das Molekulargewicht, 292 Da, und dann die Summenformel,  $C_{16}H_{20}O_5$  ermittelt werden. Die Strukturaufklärung erfolgte durch *Prof. O. Sterner*. In Abbildung 4-7 ist die Strukturformel dargestellt.

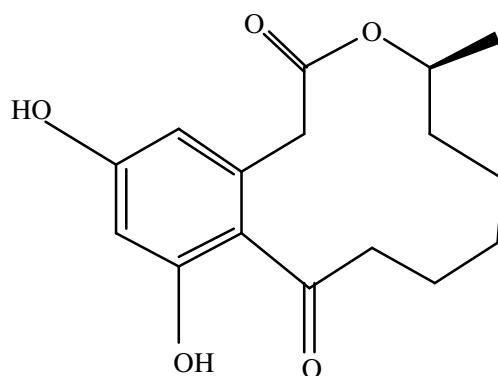
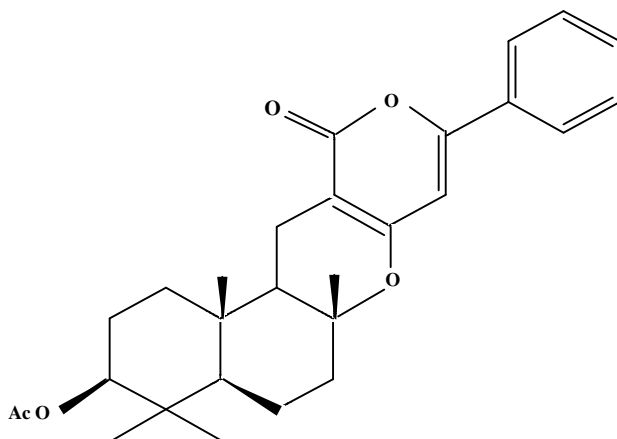


Abbildung 4-7: Die Struktur von S-Curvularin.

#### 4.1.3.3 Die STAT-1-Signaltransduktionswege in humanen HeLa-S3-Zellen hemmende Verbindung S14-95

Die Verbindung wurde von der Arbeitsgruppe um *PD Dr. G. Erkel* isoliert, charakterisiert und von *Prof. O. Sterner* strukturell untersucht. Die Untersuchungen des Einflusses dieser Verbindung auf die entzündungsrelevanten Promotoren und die Transkriptionsfaktoren sollten hier noch näher untersucht werden.

Das Molekulargewicht der Verbindung beträgt 450 kDa. Die Strukturformel von S14-95 ist in Abbildung 4-8 gezeigt.



*Abbildung 4-8: Struktur von S14-95.*

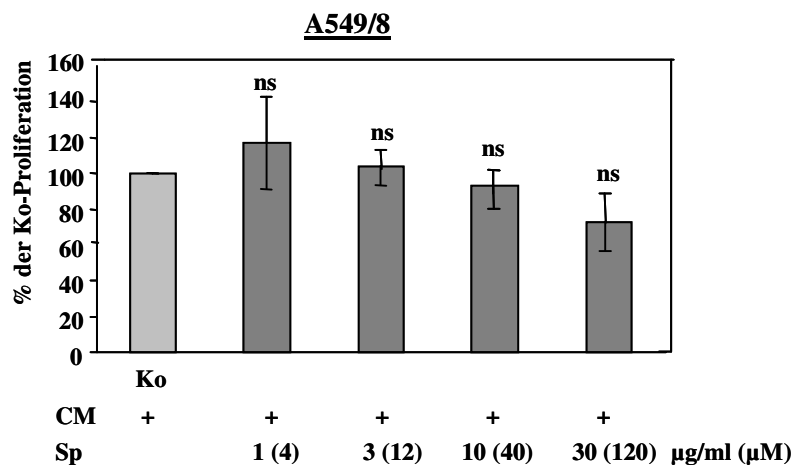
#### **4.1.4 Biologische Aktivität der isolierten Substanzen**

##### **4.1.4.1 Wirkung der Substanzen auf das Wachstum humaner Zelllinien in der MTS-Proliferations-Analyse**

###### **4.1.4.1.1 Sporogen-A01**

In der bei Promotorstudien und RNA-Analysen zur Evaluation des iNOS-Einflusses im Entzündungsgeschehen verwendeten Zelllinie A549/8 zeigte sich eine nur geringe konzentrationsabhängige Inhibition der Zellproliferation durch Sporogen-A01-Behandlung (Abb. 4-9). In HeLa-S3-Zellen jedoch kam es zu einer deutlicheren Hemmung bei höheren Sporogen-A01- Konzentrationen (Daten nicht gezeigt).

Sporogen-A01 hemmte die Proliferation bei einer Konzentration von 30 µg/ml um 20 % verglichen mit dem Wachstum von Kontroll-Zellen. Im Bereich des größten Einflusses der Substanz im Promotor-Screening und in den RNase-Verdauungsschutzanalysen kam es zu keiner starken Hemmung der Proliferation von A549/8-Zellen.



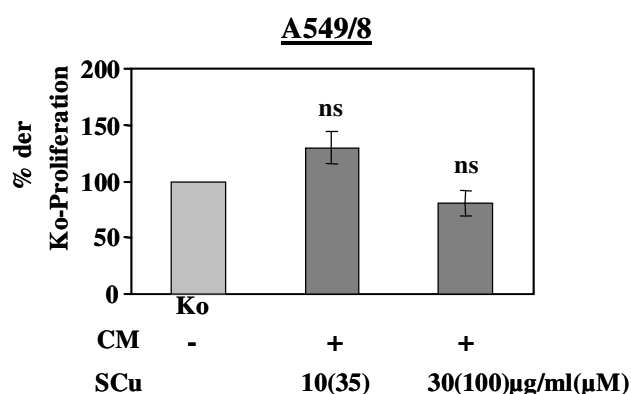
**Abbildung 4-9: Einfluss des Sporogen-A01 auf die A549/8-Zellproliferation.** Nach achtstündiger Behandlung von A549/8-Zellen mit einem Cytokingemisch (CM) zusammengesetzt aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und vorheriger Vorbehandlung mit der angegebenen Sporogen-A01-Konzentration (Sp) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol wurden die Zellen mit einem

Sechstel-Volumen Cell-Titer-MTS-Reagenz für eine Stunde bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 540 nm photometrisch bestimmt. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relativen proliferationsabhängigen Absorptionen entsprechend der Lebendzellzahl in unbehandelten Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (Ko). Ns: nicht signifikant verschieden von CM.

#### 4.1.4.1.2 S-Curvularin

In der bei den Promotorstudien und RNA-Analysen verwendeten Zelllinie A549/8 zeigte sich kein Einfluss auf das Wachstum dieser Zellen (Abb. 4-10), in HeLa-S3-Zellen kam es jedoch zu einer deutlichen Hemmung bei höheren S-Curvularin-Konzentrationen (nicht gezeigt).

S-Curvularin hatte geringen Einfluss auf die Proliferation der A549/8-Zellen, nachdem die Zellen 26 h mit der Substanz inkubiert und davon 8 h mit einem Cytokin-Gemisch induziert wurden.



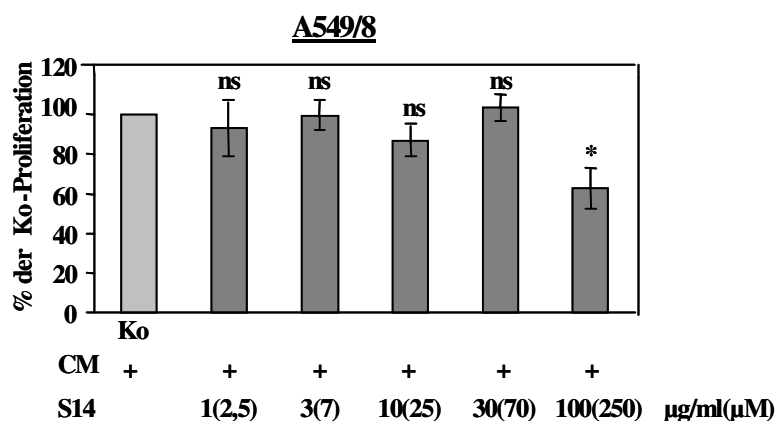
**Abbildung 4-10: Einfluss des S-Curvularin auf die A549/8-Zellproliferation.** Nach achtstündiger Behandlung von A549/8-Zellen mit einem Cytokin-Gemisch (CM) und vorangegangener 18-stündiger Vorbehandlung mit der angegebenen S-Curvularin-Konzentration (SCu) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol wurden die Zellen mit einem Sechstel des Volumens (20  $\mu$ l) des MTS-Reagenz für 1 h bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 540 nm photometrisch bestimmt. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) re-

präsentieren die relativen proliferationsabhängigen Absorptionen entsprechend der Lebendzellzahl in unbehandelten Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (Ko). ns: nicht signifikant verschieden von CM.

Dies könnte auch ein Hinweis sein, dass die Wirkung auf die Synthese von Biomolekülen wie DNA, RNA und Protein gering ist. Dies wurde von der Arbeitsgruppe um PD Dr. G. Erkel untersucht (Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.4.1.3 S14-95

In der bei den Promotorstudien und RNA-Analysen verwendeten Zelllinie A549/8 zeigte sich ein geringer Einfluss von S14-95 auf das Wachstum dieser Zellen. In HeLa-S3-Zellen kam es zu einer deutlichen Hemmung bei höheren S14-95-Konzentrationen (Daten nicht gezeigt). S14-95 hemmt die Proliferation bei einer Konzentration von 100 µg/ml (250 µM) in Medium ohne Serum um 50 % in Relation zum Wachstum der Zellen unter Normalbedingungen.



**Abbildung 4-11: Einfluss des S14-95 auf die A549/8-Zellproliferation.** Nach achtstündiger Behandlung von A549/8-Zellen mit einem Cytokin-Gemisch (CM) und vorheriger Vorbehandlung mit der angegebenen S14-95-Konzentration (S14) bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO wurden die Zellen mit einem Sechstel-Volumen Cell-Titer-MTS-Reagenz für eine Stunde bei 37°C inkubiert und die

Absorption bei 540 nm photometrisch bestimmt. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relativen proliferationsabhängigen Absorptionen entsprechend der Lebendzellzahl in unbehandelten Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (Ko). \*,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

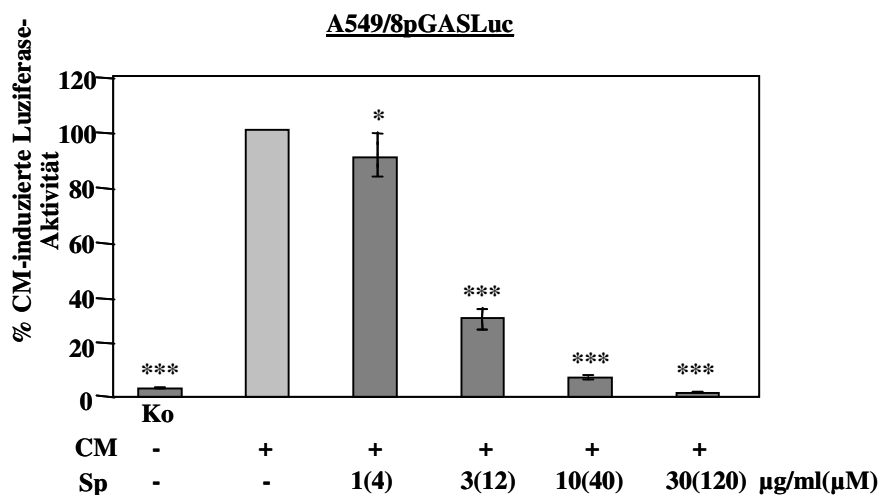
Im Bereich der größten Substanzwirkung im Promotor-Screening und in den RNase-Verdauungsschutzanalysen kam es lediglich bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 100 µg/ml zu einer Hemmung der Proliferation von A549/8-Zellen um 35 % (Abbildung 4-11).

#### 4.1.4.2 Effekte der isolierten Wirkstoffe auf die Funktion entzündungsrelevanter Transkriptionsfaktoren in Reporter-gen-Analysen mit stabilen humanen Zelllinien

##### 4.1.4.2.1 Sporogen-A01

##### 4.1.4.2.1.1 Wirkung von Sporogen-A01 auf die JAK-STAT-Signaltransduktion in stabilen A549/8 pGASLuc-Zellen

Dazu wurden A549/8-Zelllinien verwendet, die stabil mit einem Konstrukt, das fünf GAS-Elemente vor einem Basalpromotor (pGASLuc, Stratagene) enthielt, transfiziert worden waren. Die Reporter-gen-expression war mit einem Cytokingemisch mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in diesen Zellen stimulierbar. In Induktionsversuchen kommt es zu einer Erhöhung der Reporter-gen-Expression um mindestens das 10-fache gegenüber der Kontrolle ohne Cytokin-Gemisch. Sporogen-A01 zeigte einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Aktivität des GAS-abhängigen Minimalpromotors. Bei einer Sporogen-A01-Konzentration von 30  $\mu\text{g/ml}$  (120  $\mu\text{M}$ ) wurde die Promotoraktivität fast auf Basalwerte gehemmt.

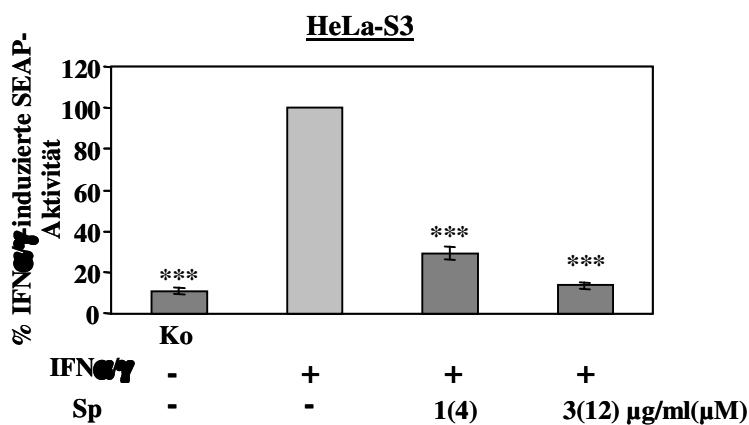


**Abbildung 4-12: Einfluss des Sporogen-A01 auf die GAS-vermittelte Promotoraktivität in stabil transfizierten A549/8pGASLuc-Zellen.** Nach achtzehnstündiger Behandlung von A549/8-Zellen mit den angegebenen Sporogen-A01-Konzentrationen (Sp) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol wurden die Zellen mit einem Cytokin-Gemisch

(CM) zusammengesetzt aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) für sechs Stunden bei 37°C inkubiert und danach mit 200  $\mu\text{l}$  des Passive-Lysis-Puffers versetzt. Kontrollzellen wurden ohne CM in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Anschließend die Luziferase-Aktivität sowie die Proteinkonzentration des Lysatüberstandes gemessen. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luziferaseaktivität im Vergleich zu CM-behandelten Zellen (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; \*,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

Dies spricht für eine spezifische Reaktion der hemmenden Signalmoleküle auf die Anwesenheit von Sporogen-A01 in diesen stabil transfizierten Zellen, wobei Signalmoleküle des JAK-STAT-Weges wie STAT-1 $\alpha$  eine wichtige Rolle spielen sollten. Der Angriffspunkt der Verbindung könnte sowohl direkt der STAT-1 $\alpha$ -Dimer oder die für die Aktivierung und Dimerisierung notwendigen Tyrosin-Kinasen wie z.B. die JAK-Kinasen sein (siehe auch Abb. 1-2, Abb. 5-1).

Zusätzlich konnte bei einer parallel durchgeführten transienten Transfektion von HeLa-S3-Zellen mit einem pTK-GAS/ISRE-Konstrukt (ERKEL *et al.*, 1996) eine ähnlich große Hemmung der Reportergenexpression konstatiert werden. Sporogen-A01 zeigte auch in diesen Experimenten einen Einfluss auf die Aktivität des Promotors wie in den stabil transfizierten A549/8-Zellen, der sich hier allerdings schon bei einer Sporogen-A01-Konzentration von 3  $\mu$ g/ml (12  $\mu$ M) der Aktivität des Promotors ohne Cytokininduktion näherte (Abbildung 4-13). Dies könnte an der höheren Empfindlichkeit der HeLa-S3-Zellen gegenüber der Substanz liegen, welche sich schon bei den Untersuchungen zur Zytotoxizität im Vergleich mit A549/8-Zellen zeigte (Abbildung 4-9).



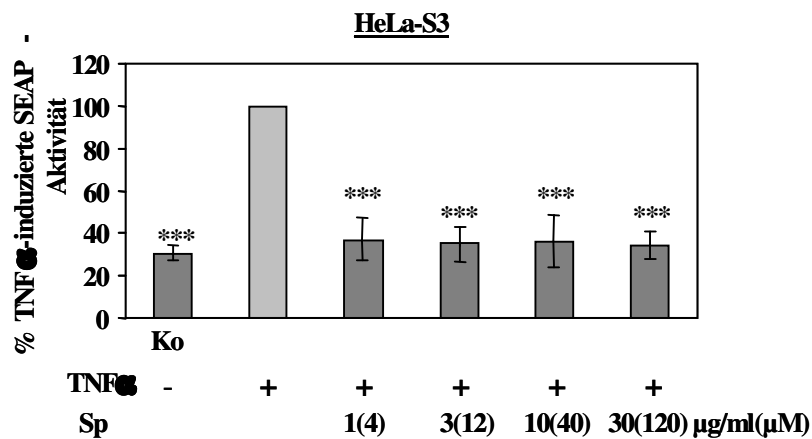
**Abbildung 4-13: Einfluss des Sporogen-A01 auf die GAS/ISRE-vermittelte Promotoraktivität in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen.** Die Zellen wurden transient mit pTKGAS/ISRESEAP durch Elektroporation transfiziert. Nach 24-stündigem Wachstum der transfizierten HeLa-S3-Zellen in Normalmedium wurden die Zellen mit einem Cytokin-Gemisch (5 ng/ml IFN- $\alpha$  und 10 ng/ml IFN- $\gamma$ ) (IFN $\alpha/\gamma$ ) und den angegebenen

Sporogen-A01-Konzentrationen (Sp) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol für 48 Stunden bei 37°C inkubiert und danach je 20  $\mu$ l des Überstandes für den SEAP-Aktivitäts-Analyse verwendet. Kontrollzellen wurden ohne CM in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative SEAP-Aktivität im Vergleich zu Interferon-behandelten Zellen (IFN $\alpha/\gamma$ ). \*\*\*;  $P < 0,001$  vs IFN $\alpha/\gamma$ .

#### 4.1.4.2.1.2 Wirkung von Sporogen-A01 auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte Signaltransduktion

Dazu wurde die humane HeLa-S3-Zelllinie verwendet, die transient mit einem Konstrukt, das fünf NF- $\kappa$ B-Elemente vor einem Minimalpromotor (ERKEL, 1996) enthält,

transfiziert worden waren. Die Expression des Reportergens war mit TNF- $\alpha$  stimulierbar und es kam zu einer Erhöhung der Reportergen-Expression um das 2 bis 3-fache gegenüber den nicht stimulierten Zellen. Sporogen-A01 zeigte auch in diesen Experimenten einen Einfluss auf den NF- $\kappa$ B-abhängigen Promotor in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen, wobei sich keine Konzentrationsabhängigkeit manifestierte (Abb. 4-14).



**Abbildung 4-14: Einfluss des Sporogen-A01 auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte Minimalpromotoraktivität in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen.** Die Zellen wurden transient mit pGL3NF- $\kappa$ BSEAP durch Elektroporation transfiziert. Nach 24-stündigem Wachstum der elektroporierten HeLa-S3-Zellen in Normalmedium wurden die Zellen mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und den ange-

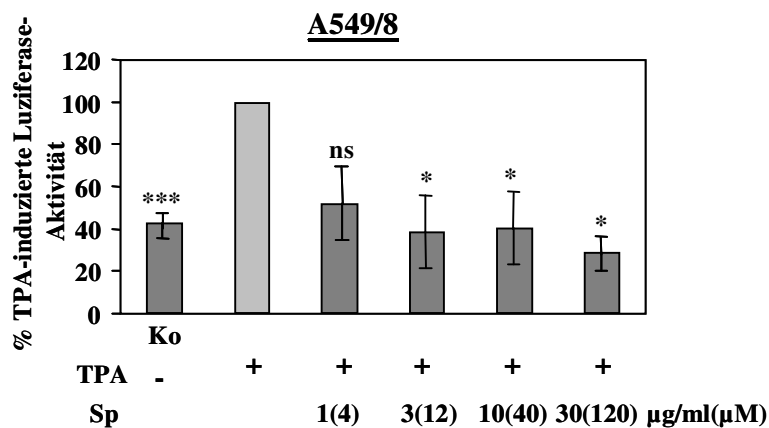
gebenen Sporogen-A01-Konzentrationen (Sp) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol für 48 Stunden bei 37°C inkubiert und danach je 20  $\mu$ l des Überstandes für den SEAP-Aktivitäts-Analyse verwendet. Kontrollzellen wurden ohne CM in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative SEAP-Aktivität im Vergleich zu TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen (TNF $\alpha$ ).\*\*\*,  $P < 0,001$  vs TNF $\alpha$ .

#### 4.1.4.2.1.3 Wirkung von Sporogen-A01 auf die COX-2-Promotoraktivität

Dazu wurden die humane Zelllinien verwendet, die mit dem 1.4-kb-COX-2-Promotor (pGL3hCOX2(1.4)Luc; SILBERBORTH *et al.*, 2001) kloniert vor Luziferase transient transfiziert wurden. Der COX-2-Promotor war mit TPA stimulierbar und es kam zu einer Erhöhung der Reportergenexpression um das 2- bis 3-fache gegenüber der Kontrolle ohne TPA bei A549/8-Zellen nach 12 h Induktionsdauer.

Sporogen-A01 zeigte in diesen Experimenten einen deutlichen, konzentrationsunabhängigen Einfluss auf den COX-2-Promotor, wobei sich die Promotoraktivität bei einer Konzentration von 30  $\mu$ g/ml (120  $\mu$ M) der basalen Aktivität in Kontrollzellen annäherte.





**Abbildung 4-15: Einfluss des Sporogen-A01 auf die TPA-induzierte COX-2-Promotoraktivität in transient transfizierten A549/8-Zellen.** Die Zellen wurden transient mit pGl<sub>3</sub>hCOX(1.4)Luc durch die PEI-Methode transfiziert. Nach achtzehnstündiger Behandlung von A549/8-Zellen mit den angegebenen Sporogen-A01-Konzentrationen (Sp) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol wurden die Zellen für 12 Stunden bei 37°C mit TPA (20 ng/ml) inkubiert und da-

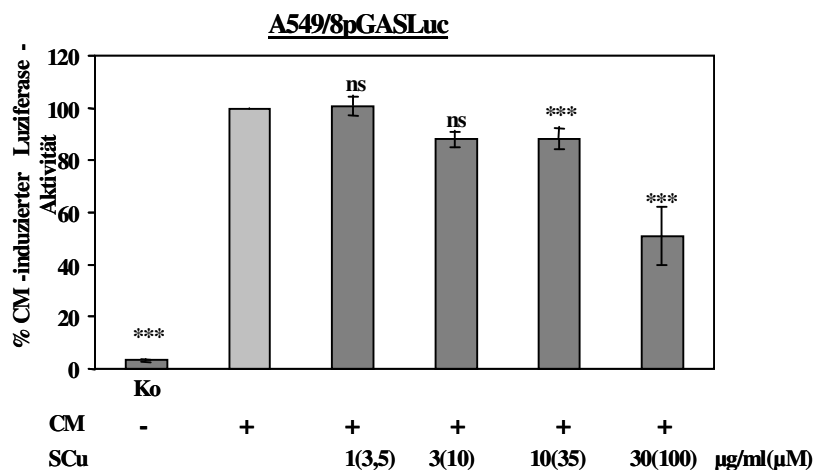
nach mit 200 µl des Passive-Lysis-Puffers versetzt. Davon wurden je 40 µl für die Luziferase- und Renilla-Messung verwendet. Kontrollzellen wurden ohne TPA in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert ± SEM) repräsentieren die relative Luziferaseaktivität im Vergleich zu TPA-behandelten Zellen (TPA). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs TPA; \*,  $P < 0,05$  vs TPA; ns: nicht signifikant verschieden von TPA.

#### 4.1.4.2.2 S-Curvularin

##### 4.1.4.2.2.1 Wirkung von S-Curvularin auf die JAK-STAT-Transduktionskaskade

Dazu wurde die A549/8-Zelllinie stabil transfiziert mit pGASLuc verwendet. Diese war mit einem Cytokin-Gemisch mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  stimulierbar und es kam zu einer Erhöhung der Reportergenexpression um weit mehr als das 10-fache gegenüber der Kontrolle ohne Cytokin-Behandlung. S-Curvularin zeigte einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität des Promotors in A549/8-Zellen, der sich erst bei einer Konzentration von 30 µg/ml in einer Halbierung der Reportergenaktivität äußerte. Dies spricht für eine spezifische Reaktion der Signalmoleküle auf die Anwesenheit von S-Curvularin in diesen stabil transfizierten Zellen, wobei Signalmoleküle des JAK-STAT-Weges wie STAT-1 $\alpha$  eine wichtige Rolle spielen könnten.

Zum Vergleich konnte bei einer parallel von der Arbeitsgruppe PD Dr. G. Erkel in HeLa-S3-Zellen transient durchgeführten Versuchsreihe ein stärkerer Effekt von S-Curvularin mit einem IC<sub>50</sub> von 14 µg/ml (50 µM) konstatiert werden.



**Abbildung 4-16: Einfluss des S-Curvularin auf die GAS/ISRE-vermittelte Promotoraktivität in stabil transfizierten A549/8pGAS Luc-Zellen.** Nach achtzehnstündiger Behandlung von A549/8-Zellen mit den angegebenen S-Curvularin-Konzentrationen (SCu) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol wurden die Zellen mit einem Cytokin-Gemisch (IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml)

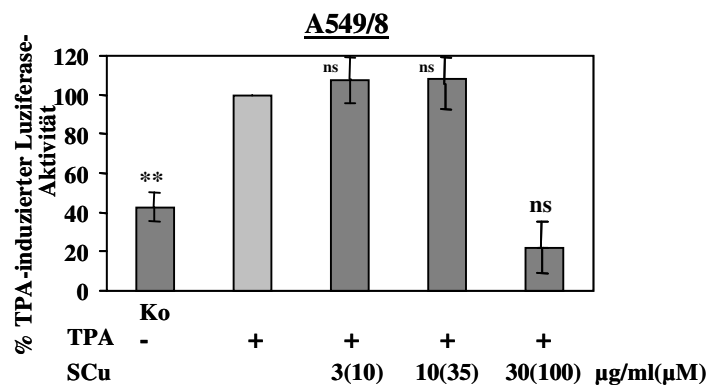
und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)) für sechs Stunden bei 37°C inkubiert (CM) und danach mit 200 µl des Passive-Lysis-Puffers versetzt. Kontrollzellen wurden ohne CM in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luciferaseaktivität im Vergleich zu CM-behandelten Zellen (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

#### 4.1.4.2.2.2 Wirkung von S-Curvularin auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte Signaltransduktion

S-Curvularin zeigte bei einer Konzentration von 15 µg/ml (60 µM) eine 50%ige Inhibition der NF- $\kappa$ B-abhängigen Reporter-Gen-Aktivität in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen. Hiermit ist davon auszugehen, dass diese Verbindung im humanen System sich auch auf die durch NF- $\kappa$ B-vermittelte Signaltransduktion auswirkt.

#### 4.1.4.2.2.3 Wirkung von S-Curvularin auf die COX-2-Promotoraktivität

Für diese Untersuchung wurden humane A549/8-Zellen transient mit pGL3hCOXLuc transfiziert. Diese war mit TPA innerhalb von 12 h induzierbar und es kam zu einer Erhöhung der Reporter-Gen-Expression um das 2-3-fache gegenüber der Kontrolle ohne Phorbol ester bei A549/8-Zellen. S-Curvularin beeinflusste den COX-2-Promotor lediglich bei einer Konzentration von 30 µg/ml (100 µM), wobei die Promotoraktivität auf die Basalaktivität gesenkt wurde (Abb. 4-17). Betrachtet man die COX-2-Promotoraktivität nach Transfektion von pGL3hCOX(1.4)Luc in HeLa-S3-Zellen, so ergibt sich für die Konzentrationsstufen um 20 µg/ml (70 µM) eine ähnliche Verringerung der Promotoraktivität (Arbeitsgruppe PD Dr. G. Erkel).



**Abbildung 4-17: Einfluss des S-Curvularin auf die TPA-induzierte COX-2-Promotoraktivität in transient transfizierten A549/8-Zellen.** Die Zellen wurden transient mit pGl<sub>3</sub>hCOX(1.4)Luc durch die PEI-Methode transfiziert. Nach achtzehnstündiger Behandlung von A549/8-Zellen mit den angegebenen S-Curvularin-Konzentrationen (SCu) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol wurden die Zellen für 12 Stunden bei 37°C mit

Phorbol ester (20 ng/ml TPA) inkubiert (TPA) und danach mit 200 µl des Passive-Lysis-Puffers versetzt. Davon wurden je 40 µl für die Luziferase- und die Renilla-Messung verwendet. Kontrollzellen wurden ohne TPA in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert ± SEM) repräsentieren die relative Luziferaseaktivität im Vergleich zu TPA-behandelten Zellen (TPA). \*\*,  $P < 0,01$  vs TPA; ns: nicht signifikant verschieden von TPA.

#### 4.1.4.2.2.4 Wirkung von S-Curvularin auf die TNF- $\alpha$ -Promotoraktivität

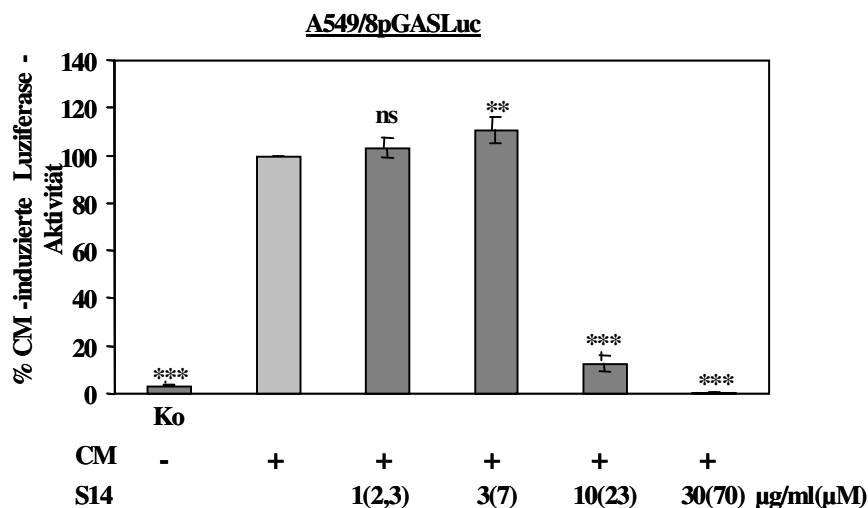
Dazu wurden humane Jurkat-Zellen verwendet, die transient mit pJRTNFpro transfiziert wurden. Diese waren mit Phorbol ester/Ionophor stimulierbar und es kam nach 12 h zu einer Erhöhung der Reporter gen-Expression um das 5-10-fache gegenüber der Kontrolle ohne TPA/Ionomycin-Behandlung. S-Curvularin zeigte einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität des TNF- $\alpha$ -Promotors, wobei die Reporter gen-Aktivität konzentrationsabhängig mit einem IC<sub>50</sub> von 10-15 µg/ml (Daten erhoben von PD Dr.G. Erkel) erniedrigt wurde.

#### 4.1.4.2.3 S14-95

##### 4.1.4.2.3.1 Wirkung von S14-95 auf die JAK2-STAT-1 $\alpha$ -Signaltransduktions-Kaskade

Zur Ermittlung der Wirkung von S14-95 auf die GAS-abhängige Signaltransduktion wurden A549/8pGASLuc-Zellen mit einem unter anderen Cytokinen auch IFN- $\gamma$  enthaltendes Gemisch induziert. Die Cytokin-induzierte iNOS-Promotoraktivität wurde als Richtwert 100 % für die Hemmung durch Pilzextrakte angenommen. Die Reporter gen-Expression wurde in induzierten gegenüber nicht-stimulierten A549/8pGASLuc-Reporter-Zellen um das um mindestens das 10-fache gesteigert. S14-95 zeigte einen Einfluss auf die Aktivität des Promotors in A549/8-

Zellen, der sich erst bei einer S14-95-Konzentration von 10 µg/ml (23 µM) in einer relevanten Reduktion der Reportergenaktivität äußerte (Abbildung 4-18). Dies spricht für eine spezifische Reaktion der Signalmoleküle auf die Anwesenheit von S14-95 in diesen stabil transfizierten Zellen. Zum Vergleich konnte bei einer parallel durchgeführten Versuchsreihe durch transiente Transfektion von HeLa-S3-Zellen eine ähnliche inhibitorische Wirkung des Sporogen-A01 konstatiert werden. S14-95 zeigte in den stabil transfizierten A549/8-Zellen bei 10 µg/ml (23 µM), jedoch in transienten HeLa-S3-Zellen schon bei einer Konzentration von 5 µg/ml (12 µM) eine fast basale Reportergen-Antwort ähnlich der nicht-induzierter Kontrollzellen (Daten erhoben von der Arbeitsgruppe *PD Dr. G. Erkel*). Dies könnte in der höheren Empfindlichkeit der HeLa-S3-Zellen gegenüber der Substanz begründet liegen (Daten nicht gezeigt).



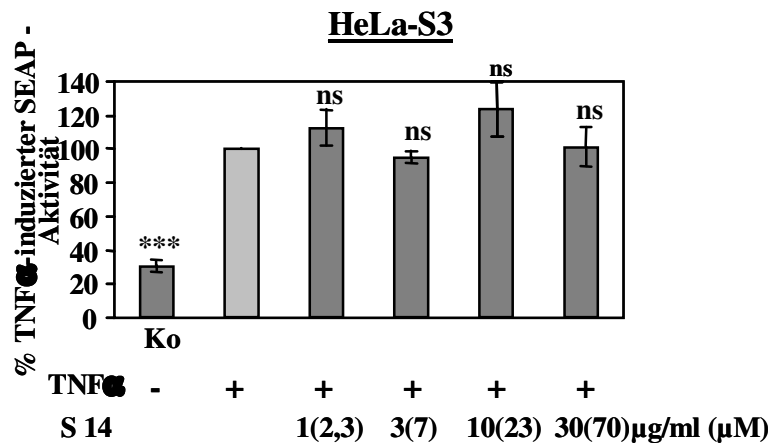
**Abbildung 4-18: Einfluss des S14-95 auf die GAS-vermittelte Promotoraktivität in stabil transfizierten A549/8pGASLuc-Zellen.** Nach achtzehnstündiger Behandlung von A549/8-Zellen mit den angegebenen S14-95-Konzentrationen (S14) bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO wurden die Zellen mit einem aus IFN-γ (100 U/ml), IL-1β

(50 U/ml) und TNF-α (10 ng/ml) bestehenden Cytokin-Gemisch (CM) für sechs Stunden bei 37°C inkubiert und danach mit 200 µl des Passive-Lysis-Puffers versetzt. Kontrollzellen wurden ohne CM in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert ± SEM) repräsentieren die relative Luziferaseaktivität im Vergleich zu CM-behandelten Zellen (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; \*\*,  $P < 0,01$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

#### 4.1.4.2.3.2 Wirkung von S14-95 auf die NF-κB-vermittelte Signaltransduktion

Dazu wurden die humane HeLa-S3-Zelllinie verwendet, die mit einem multimeren NF-κB-Element-Konstrukt (pNF-κBSEAP; *Erkel, 2000*) vor einem Minimalpromotor transient transfiziert wurde. Dieses Konstrukt zeigte zwar eine mit TNF-α (10 ng/ml) stimulierbare

Expression und es kam zu einer Erhöhung der Reporter-Gen-Expression um das 2- bis 3-fache im Vergleich zur Kontrolle ohne TNF- $\alpha$ -Behandlung. S14-95 zeigte in diesen Experimenten keinen Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-abhängige SEAP-Aktivität in HeLa-S3-Zellen (Abb. 4-19).



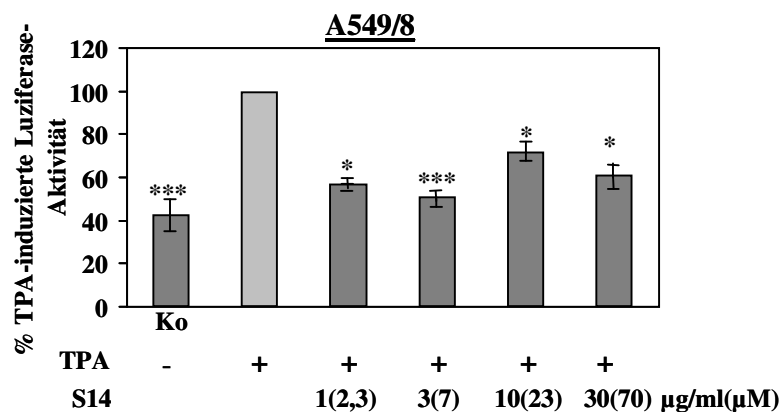
**Abbildung 4-19: Einfluss des S14-95 auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte SEAP-Aktivität in transient transfizierten HeLa-S3-Zellen.** Die Zellen wurden transient mit pGl<sub>3</sub>NF- $\kappa$ BSEAP durch Elektroporation transfiziert. Nach 24-stündigem Wachstum der elektroporierten HeLa-S3-Zellen in Normalmedium wurden die Zellen mit einem 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und den angegebenen S14-95-Konzentrationen (S14) bzw. mit dem Lösungsmittel

DMSO für 48 h bei 37°C inkubiert und danach je 20  $\mu$ l des Überstandes für den SEAP-Aktivitäts-Analyse verwendet. Kontrollzellen wurden ohne TNF- $\alpha$  in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative SEAP-Aktivität im Vergleich zu TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen (TNF $\alpha$ ). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs TNF $\alpha$ :TNF $\alpha$ ; ns: nicht signifikant verschieden von TNF $\alpha$ .

#### 4.1.4.2.3.3 Wirkung von S14-95 auf die COX-2-Promotoraktivität

Dazu wurde die humane Zelllinie A549/8 verwendet, die transient mit pGl<sub>3</sub>hCOX(1.4)Luc transfiziert wurde. Der humane COX-2-Promotor war mit TPA (20 ng/ml) stimulierbar und es kam zu einer Erhöhung der Reporter-Gen-Expression um das 2- bis 3-fache gegenüber der Kontrolle ohne Phorbol-ester nach 12 h Induktionsdauer.

S14-95 zeigte in diesen Experimenten einen Einfluss auf den COX-2-Promotor vor Luziferase in transient transfizierten A549/8-Zellen, wobei die Promotoraktivität konzentrationsunabhängig fast bis auf Basalaktivität reduziert wurde (Abbildung 4-20).



**Abbildung 4-20: Einfluss des S14-95 auf die TPA-induzierte COX-2-Promotor-Aktivität in transient transfizierten A549/8-Zellen.** Die Zellen wurden transient mit pGL3hCOX(1.4)Luc durch die PEI-Methode transfiziert. Nach achtzehnstündiger Behandlung von A549/8-Zellen mit den angegebenen S14-95-Konzentrationen (S14) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol wurden die Zellen mit einem für 12

h bei 37°C mit TPA inkubiert (TPA) und danach mit 200 µl des Passive-Lysis-Puffers versetzt. Davon wurden je 40 µl für die Luziferase- und die Renilla-Messung verwendet. Kontrollzellen wurden ohne TPA in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luziferaseaktivität im Vergleich zu TPA-behandelten Zellen (TPA). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; \*,  $P < 0,05$  vs CM.

#### **4.1.4.2.3.4 Wirkung von S14-95 auf die TNF- $\alpha$ -Promotoraktivität**

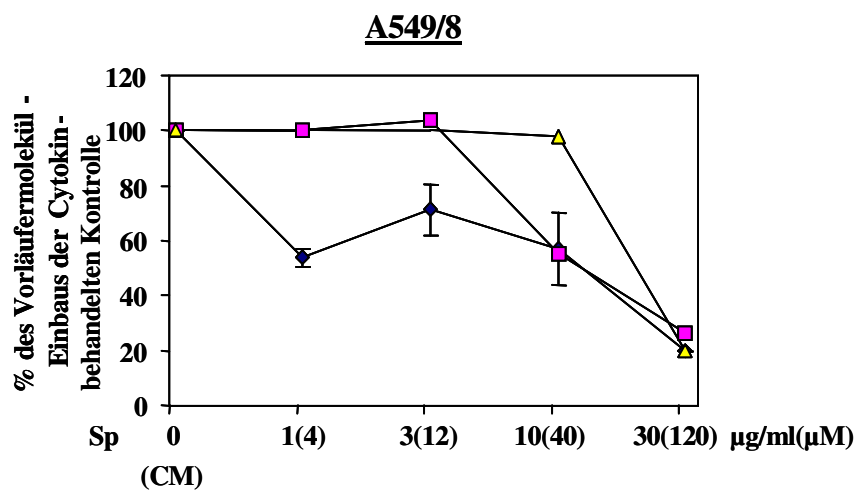
Dazu wurden die humane Zelllinie Jurkat verwendet, die transient mit einem 2.6-kb-Fragment des TNF- $\alpha$ -Promotors (pJRTNFpro) transfiziert wurde (Arbeitsgruppe PD Dr. G. Erkel). Diese war mit TPA stimulierbar und es kam zu einer Erhöhung der Reporterexpression (Luziferase) um das 5-10-fache gegenüber der Kontrolle ohne Phorbol ester nach 12h Induktionsdauer. Es wurde eine 50%ige Hemmung des TNF- $\alpha$ -Promotors bei einer Konzentration von 6 µg/ml (14 µM) S14-95 gegenüber der maximal induzierten Kontrolle nach Cytokin-Induktion erreicht.

#### **4.1.4.2.3.5 Wirkung von S14-95 auf die NFAT-Signaltransduktion**

Dazu wurde von der Arbeitsgruppe um PD Dr. G. Erkel die humane T-Zelllinie Jurkat verwendet, die transient mit pGL3NFAT transfiziert wurde (Arbeitsgruppe PD Dr. G. Erkel). Diese war mit TPA (PMA) stimulierbar und es kam zu einer Erhöhung der Reporterexpression um das 2- bis 5-fache im Vergleich zur Kontrolle ohne Phorbol ester nach 12 h Induktionsdauer. Es ergab sich für diese Reporterexpression-Analysen eine Inhibition der NFAT-abhängigen Signaltransduktion mit einem IC<sub>50</sub> von 9 µg/ml (20 µM) durch Behandlung der Zellen mit S14-95 während der Induktion.

#### 4.1.4.3 Wirkung der isolierten Substanzen aus Pilzen auf die Makromolekülbiosynthesen (DNA-, RNA- und Proteinsynthese) in humanen Zelllinien

Die Wirkung von Sporogen-A01 auf die Synthese molekularer Biomoleküle als Indikator für die unspezifische Wirkweise der Substanz wurde in humanen A549/8-Zellen untersucht. Es zeigte sich eine Hemmung der DNA- sowie der Proteinbiosynthese, jedoch erst bei hohen Konzentrationen (30 µg/ml; 120 µM). In geringeren Konzentrationen zeigte Sporogen-A01 keine starke Inhibition der Biomolekülelongation, lediglich für die RNA-Elongation lässt sich ein Effekt bei Konzentrationen mit gleichzeitig geringer Proliferationshemmung konstatieren.



**Abbildung 4-21: Wirkung von Sporogen-A01 auf die Biomolekülsynthesen.** Die 18stündige Substanz-Inkubation der A549/8-Zellen (Sp) und die nachfolgende Cytokininduktion mit einem Cytokingemisch (CM) erfolgte analog zur iNOS-Promotorinduktion in A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen, jedoch gleichzeitig mit der Induktion wurde die Inkubation mit dem jeweiligen <sup>3</sup>H-markierten

Vorläufermoleküls durchgeführt. Die Zellen wurden nach 4 Stunden in 10 % TCA lysiert und auf Filter übertragen, deren <sup>3</sup>H-Gehalt durch eine LSC-Messung ermittelt wurde. Die Punkte (Mittelwert ± SEM) repräsentieren die relativen <sup>3</sup>H-Werte entsprechend der <sup>3</sup>H-Werte in unbehandelten Zellen nach Induktion mit dem Cytokingemisch (CM).

- ◆ - RNA-Biomolekülsynthese
- - DNA-Biomolekülsynthese
- ▲ - Protein-Biomolekülsynthese

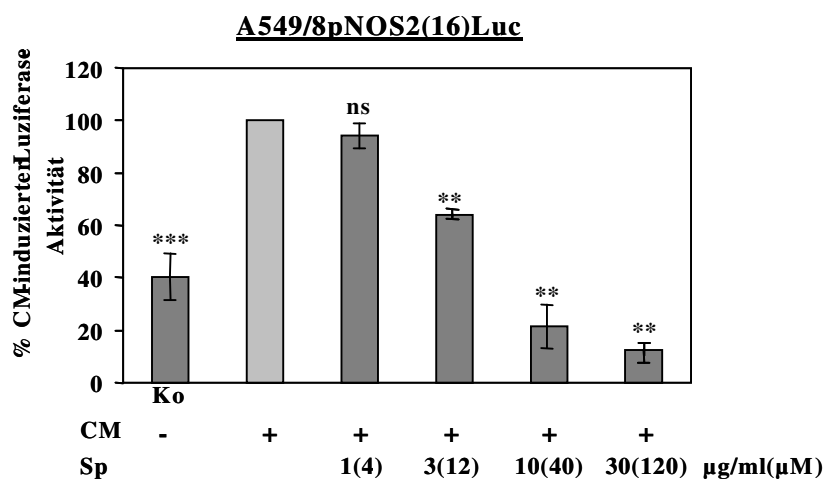
Die Analysen zur Hemmung der Biomolekülsynthesen durch S14-95 und S-Curvularin wurden in humanen Jurkat-T-Zellen durchgeführt. Hier kam es zu noch wesentlich geringeren Effekten als bei Sporogen-A01 (Daten erhoben von PD Dr. G. Erkel, Daten nicht gezeigt).

#### 4.1.4.4 Effekte der Wirkstoffe auf die Funktion von entzündungsrelevanten Promotoren in Reporter-Gen-Analysen in humanen Zelllinien

##### 4.1.4.4.1 Sporogen-A01

##### 4.1.4.4.1.1 Wirkung von Sporogen-A01 auf die iNOS-Promotor-Aktivität

Der humane iNOS-Promotor (kloniert vor ein Luziferase-Reportergen) zeigte in Cytokin-induzierten stabil transfizierten A549/8-Zellen eine Induktionsrate vom 3- bis 5-fach, verglichen mit der basalen Promotoraktivität. Durch die Behandlung der induzierten A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen mit Sporogen-A01 wurde eine Hemmung der Promotor-Aktivität in den höheren Konzentrationen bis unter Basalaktivität erreicht. Der IC<sub>50</sub> lag bei 2,3 µg/ml (9,2 µM).



**Abbildung 4-22: Wirkung von Sporogen-A01 auf die iNOS-Promotor-Aktivität in stabil transfizierten**

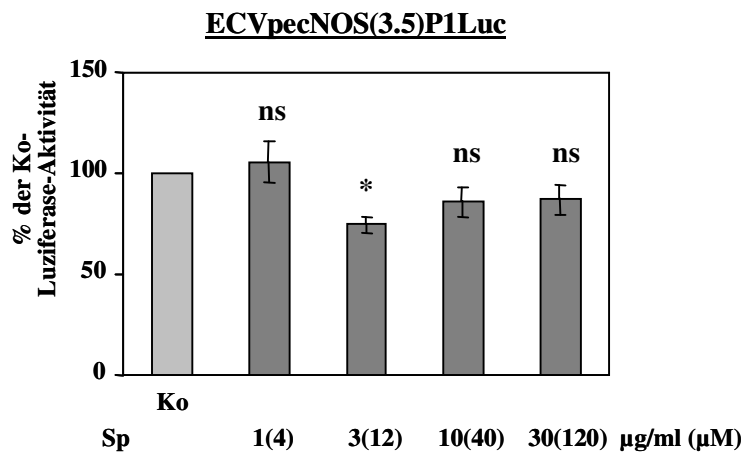
**A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen.** Nach achtzehnstündiger Behandlung von mit einem 16kb-iNOS-Promotorfragment stabil transfizierten A549/8-Zellen mit den angegebenen Sporogen-A01-Konzentrationen (Sp) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol wurden die Zellen mit einem IFN-γ (100 U/ml), IL-1β

(50 U/ml) und TNF-α (10 ng/ml) enthaltenden Cytokin-Gemisch (CM) für 4,5 Stunden bei 37°C inkubiert und danach mit 200 µl des Passive-Lysis-Puffers versetzt. Danach wurden 20 µl des Zellextrakts für die Luziferase-Messung und 10 µl des Extrakts für die Bradford-Proteinbestimmung. Kontrollzellen wurden ohne CM in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert ± SEM) repräsentieren die relative Luziferase-Aktivität verglichen mit Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM). \*\*\*, P<0,001 vs CM; \*\*, P<0,01 vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.



#### 4.1.4.4.1.2 Wirkung von Sporogen-A01 auf die eNOS-Promotor-Aktivität

Der humane ecNOS-Promotor, der stabil in die ECV304-Zellen transfiziert wurde, zeigte eine deutliche Promotor-Aktivität. Durch die Behandlung der ECVpecNOS(3.5)P1Luc-Zellen mit Sporogen-A01 wurde eine eher geringe Hemmung der Promotoraktivität in den höheren Konzentrationen erreicht.



**Abbildung 4-23: Wirkung von Sporogen-A01 auf die eNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten**

**ECVpecNOS(3.5)P1Luc-Zellen.**

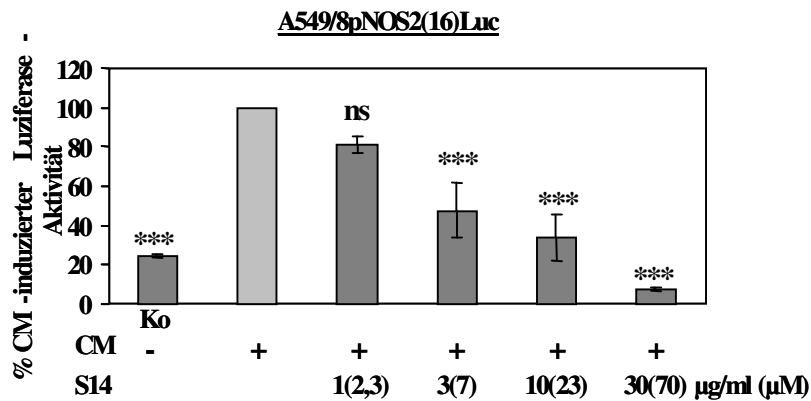
Nach achtzehnstündiger Inkubation von mit einem 3.5kb-ecNOS-Promotorfragment stabil transfizierten ECV-Zellen mit Medium ohne Serum wurden die Zellen für 4,5 Stunden bei 37°C mit den angegebenen Sporogen-A01-Konzentrationen (Sp) bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelt

und danach mit 200 µl des Passive-Lysis-Puffers versetzt. Danach wurden 20 µl des Zellextrakts für die Luziferase-Messung und 10 µl des Extrakts für die Bradford-Proteinbestimmung verwendet. Kontrollzellen wurden in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luziferase-Aktivität verglichen mit unbehandelten Zellen (Ko). \*,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von Ko.

#### 4.1.4.4.2 S14-95

##### 4.1.4.4.2.1 Wirkung von S14-95 auf die iNOS-Promotor-Aktivität

Durch die Behandlung der induzierten A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen mit S14-95 wurde eine Hemmung der humanen iNOS-Promotoraktivität in den höheren Konzentrationen bis unter die basal bereits vorhandene Aktivität des Promotors erreicht. Der  $IC_{50}$  lag bei 3 µg/ml (6,9 µM). Es zeigte sich also eine deutlich höhere Potenz des Wirkstoffes in Bezug auf die iNOS-Promotor-Hemmung als für Sporogen-A01 und S-Curvularin (Abbildung 4-24).

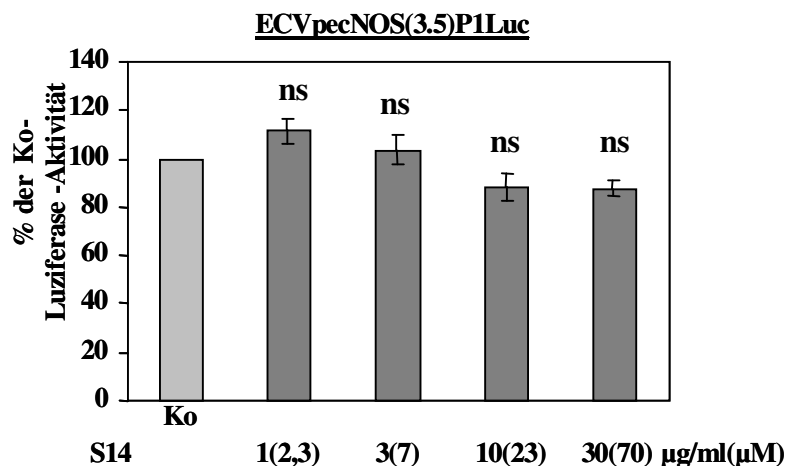


**Abbildung 4-24: Wirkung von S14-95 auf die iNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten A549/8 pNOS2(16)Luc-Zellen.** Nach achtzehnstündiger Behandlung von mit A549/8 pNOS2(16)Luc-Zellen mit den angegebenen S14-95-Konzentrationen (S14) bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO wurden die Zellen mit einem Cytokin-Gemisch (CM), beste-

hend aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) sowie TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), für 4,5 Stunden bei 37°C inkubiert und danach mit 200  $\mu$ l des Passive-Lysis-Puffers versetzt. Danach wurden 20  $\mu$ l des Zellextrakts für die Luziferase-Messung und 10  $\mu$ l des Extrakts für die Bradford-Proteinbestimmung verwendet. Kontrollzellen wurden ohne CM in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luziferase-Aktivität verglichen mit CM-behandelten Zellen (CM). \*\*\*;  $P < 0,001$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

#### 4.1.4.4.2.2 Wirkung von S14-95 auf die eNOS-Promotor-Aktivität

Die humanen ECVpecNOS(3.5)P1Luc-Zellen zeigten nach S14-95-Behandlung keine Hemmung der Promotor-Aktivität. Das entsprach den Daten für die Ermittlung der Zytotoxizität der Substanz gemessen in A549/8-Zellen.



**Abbildung 4-25: Wirkung von S14-95 auf die eNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten ECV pecNOS(3.5)P1Luc-Zellen.** Nach achtzehnstündiger Behandlung von ECV-Zellen, die mit einem 3,5-kb-eNOS-Promotorfragment stabil transfiziert wurden, mit den angegebenen S14-95-Konzentrationen (S14) bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO wurden die Zellen für 4,5 Stunden bei 37°C inkubiert und danach mit

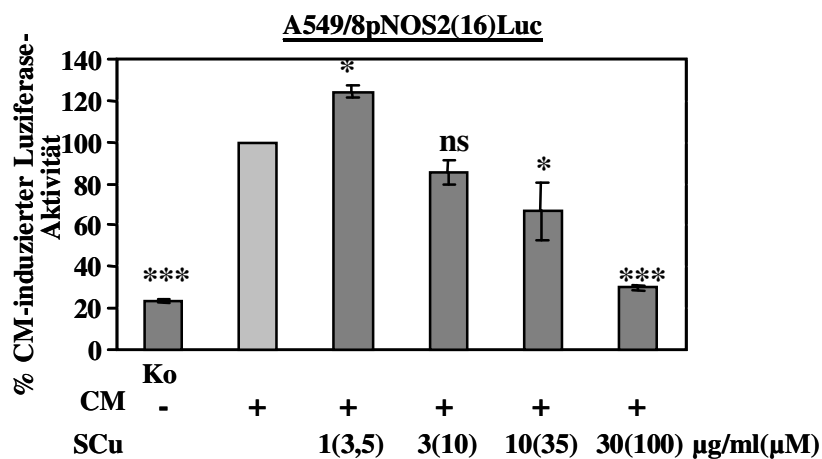
200  $\mu$ l des Passive-Lysis-Puffers versetzt. Danach wurden 20  $\mu$ l des Zellextrakts für die Luziferase-Messung und 10  $\mu$ l des Extrakts für die Bradford-Proteinbestimmung verwendet. Kontrollzellen wurden in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luziferase-Aktivität verglichen mit unbehandelten Zellen (Ko). ns: nicht signifikant verschieden von Ko.

Mit einer Hemmung der basalen Transkriptionsmaschinerie durch S14-95 war auch aufgrund der negativen Ergebnisse bezüglich der Makromolekülbiosynthese (Kap. 4.1.4.3) nicht zu rechnen.

#### 4.1.4.4.3 S-Curvularin

##### 4.1.4.4.3.1 Wirkung von S-Curvularin auf die iNOS-Promotor-Aktivität

Durch die Behandlung der induzierten A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen mit S-Curvularin wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der iNOS-Promotor-Aktivität nach Cytokin-Induktion gemessen. Der IC<sub>50</sub> lag bei 2,5 µg/ml (8,5 µM).

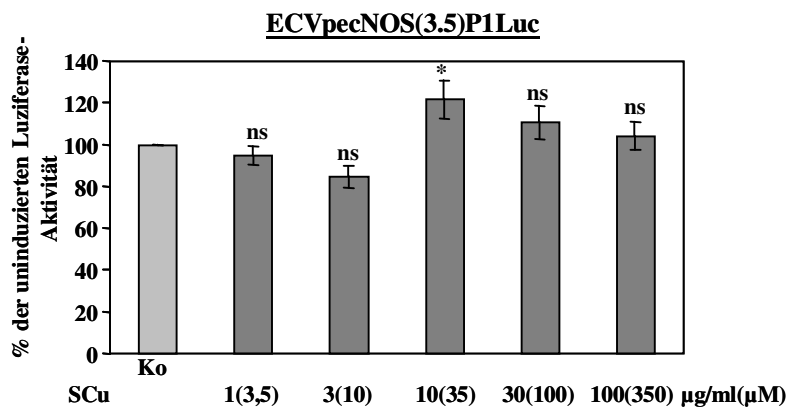


**Abbildung 4-26: Wirkung von S-Curvularin auf die iNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen.** Nach achtzehnstündiger Behandlung von mit einem 16kb-iNOS-Promotorfragment stabil transfizierten A549/8-Zellen mit den angegebenen S-Curvularin-Konzentrationen (SCu) bzw. mit dem Lösungsmittel DMSO wurden die Zellen mit einem Cytokin-

Gemisch (CM) bestehend aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) sowie TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) für 4,5 Stunden bei 37°C inkubiert und danach mit 200 µl des Passive-Lysis-Puffers versetzt. Danach wurden 20 µl des Zellextrakts für die Luciferase-Messung und 10 µl des Extrakts für die Bradford-Proteinbestimmung verwendet. Kontrollzellen wurden ohne CM in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luciferase-Aktivität verglichen mit CM-behandelten Zellen (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; \*,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

##### 4.1.4.4.3.2 Wirkung von S-Curvularin auf die eNOS-Promotor-Aktivität

Die humanen ECVpecNOS(3.5)P1Luc-Zellen zeigten nach S-Curvularin-Behandlung keine Hemmung der eNOS-Promotor-Aktivität. Das entsprach den Daten für die Ermittlung der Zytotoxizität der Substanz gemessen in A549/8-Zellen. Mit einer Hemmung der Transkriptionsmaschinerie durch S-Curvularin war auch aufgrund der negativen Ergebnisse bezüglich der Makromolekülbiosynthese (Kap. 4.1.3.3) nicht zu rechnen.



**Abbildung 4-27: Wirkung von S-Curvularin auf die eNOS-Promotor-Aktivität in stabil transfizierten**

**ECV<sub>pec</sub>NOS(3.5)P1Luc-Zellen.**

Nach achtzehnstündiger Inkubation von mit einem 3.5kb-eNOS-Promotorfragment stabil transfizierten ECV-Zellen mit serumfreiem Medium wurden die Zellen für 4.5 Stunden bei 37°C mit den angegebenen S-Curvularin-Konzentrationen

(SCu) mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelt und danach mit 200 µl des Passive-Lysis-Puffers versetzt. Danach wurden 20 µl des Zellextrakts für die Luciferase-Messung und 10 µl des Extrakts für die Bradford-Proteinbestimmung verwendet. Kontrollzellen wurden in Medium ohne FCS inkubiert (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luciferase-Aktivität verglichen mit unbehandelten Zellen (Ko). \*,  $P < 0,05$  vs Ko; ns: nicht signifikant verschieden von Ko.

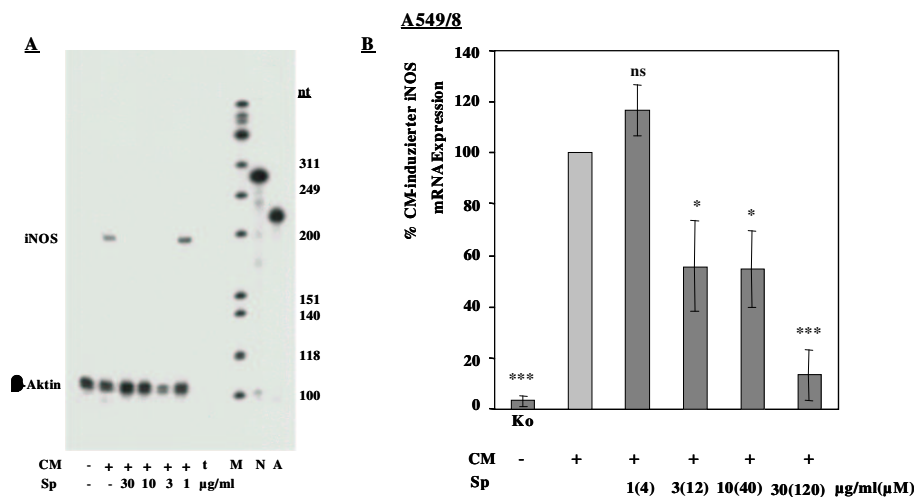
#### **4.1.4.5 Effekte der Wirkstoffe auf die mRNA-Expression der induzierbaren NO**

##### **-Synthase in humanen Zelllinien**

##### **4.1.4.5.1 Konzentrationsabhängige Hemmung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA**

##### **Expression durch Sporogen-A01**

In der humanen Zelllinie A549/8 konnte durch Behandlung der Zellen mit Sporogen-A01 eine konzentrationsabhängige Reduktion der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Für die Wirkung des Sporogen-A01 auf diese Zelllinie wurde ein IC<sub>50</sub> von 5,1 µg/ml (20 µM) aus mindestens vier analog durchgeführten, voneinander unabhängigen RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gelen ermittelt.



**Abbildung 4-28:** Hemmender Einfluss von Sporogen-A01 auf die iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen (RNase-Verdauungsschutzanalyse). Es wurden A549/8-Zellen nach 18-stündiger Vorbehandlung mit der Substanz allein mit einem Cytokingemisch, bestehend aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) sowie TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), bei 37°C 8 h in-

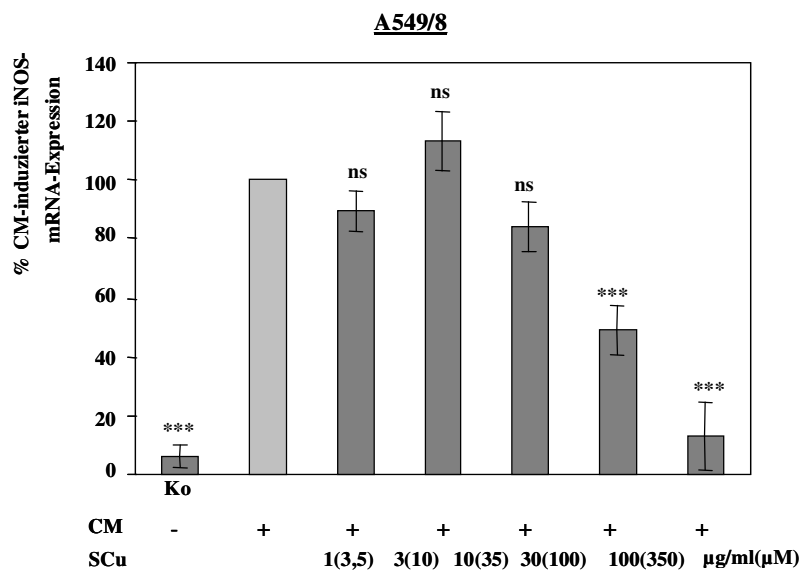
kubiert und danach mit 800  $\mu$ l GIT-Puffer versetzt. Danach wurden 30  $\mu$ g der isolierten Gesamt-RNA für die RNase-Verdauungsschutzanalyse verwendet. **A:** Repräsentatives RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gel. Es stellt die Hemmung der iNOS-mRNA durch Sporogen-A01 dar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verbindung keinen Einfluss auf die basale iNOS-Expression aufweist (nicht gezeigt). **B:** Effekt des Sporogen-A01 auf die induzierte iNOS-mRNA-Expression ermittelt aus mindestens 6 unterschiedlichen RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gelen. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative iNOS-mRNA-Expression verglichen mit Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; \*,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

A: Aktin-Sonde; CM: Cytokin-Gemisch; M: Markierte DNA-Leiter; N: iNOS-Sonde; Sp: Sporogen-A01-Konzentration; t: t-RNA; Ko: Kontrollzellen.

#### 4.1.4.5.2 Konzentrationsabhängige Inhibition der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA

##### Expression durch S-Curvularin

In der humanen Zelllinie A549/8 konnte durch Behandlung der Zellen mit S-Curvularin auch eine konzentrationsabhängige Reduktion der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression gezeigt werden. Für die Wirkung des S-Curvularin auf diese Zelllinie wurde ein IC<sub>50</sub> von 25,7  $\mu$ g/ml (88  $\mu$ M) aus mindestens vier analog durchgeführten, voneinander unabhängigen RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gelen ermittelt.



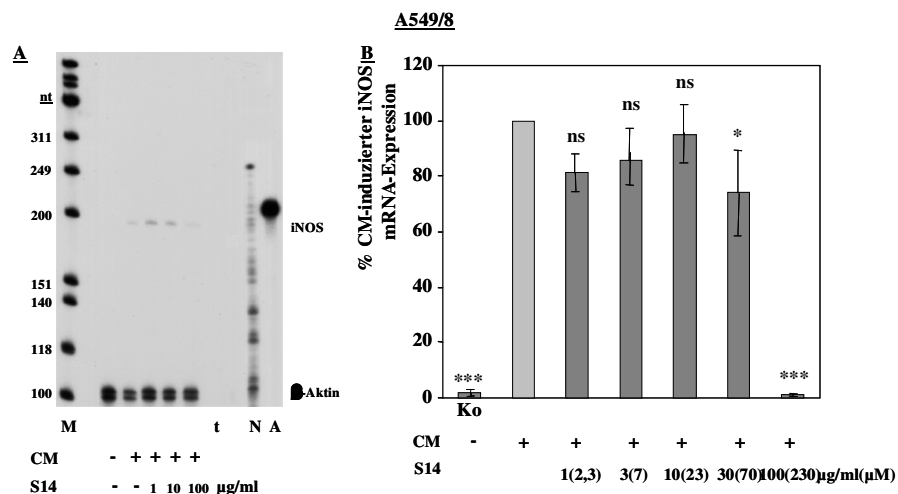
**Abbildung 4-29: Hemmender Einfluss von S-Curvularin auf die iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen (RNase-Verdauungsschutzanalyse).** Nach achtzehnstündiger Behandlung von A549/8-Zellen mit den angegebenen S-Curvularin-Konzentrationen bzw. mit dem Lösungsmittel Ethanol wurden die Zellen mit einem Cytokingemisch (IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) sowie TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)) für 8 Stunden bei 37°C inkubiert und danach mit 800  $\mu$ l GIT-Puffer versetzt. Danach wurden 30  $\mu$ g der isolierten Gesamt-RNA für die RNase-Verdauungsschutz-

analyse verwendet. Inhibitorischer Effekt des S-Curvularin auf die induzierte iNOS-mRNA-Expression ermittelt aus mindestens 6 unterschiedlichen RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gelen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verbindung keinen Einfluss auf die basale iNOS-Expression aufweist (nicht gezeigt). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative iNOS-mRNA-Expression verglichen mit Zellen nach Induktion mit dem Cytokingemisch (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

Ko: Kontrollzellen; SCu: S-Curvularin-Konzentration.

#### **4.1.4.5.3 Konzentrationsunabhängige Hemmung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA Expression durch S14-95 im Bereich hoher S14-95-Konzentrationen (0,23 mM)**

In der humanen Zelllinie A549/8 konnte durch Behandlung der Zellen mit S14-95 eine konzentrations-unabhängige Hemmung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression gezeigt werden, die sich in einer Hemmung der iNOS-mRNA-Expression bei nur bei der höchsten Konzentration von 0,23 mM bis auf Basalaktivität manifestierte.



**Abbildung 4-30:** Hemmender Einfluss von S14-95 auf die iNOS-mRNA-Expression (RNase-Verdauungsschutzanalyse). A549/8-Zellen wurden nach 18-stündiger Vorinkubation mit der Substanz 8 h mit CM induziert und danach die Gesamt-RNA isoliert und analysiert. **A:** Repräsentatives RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gel. Es stellt die Konzentrations-Wirkungs-

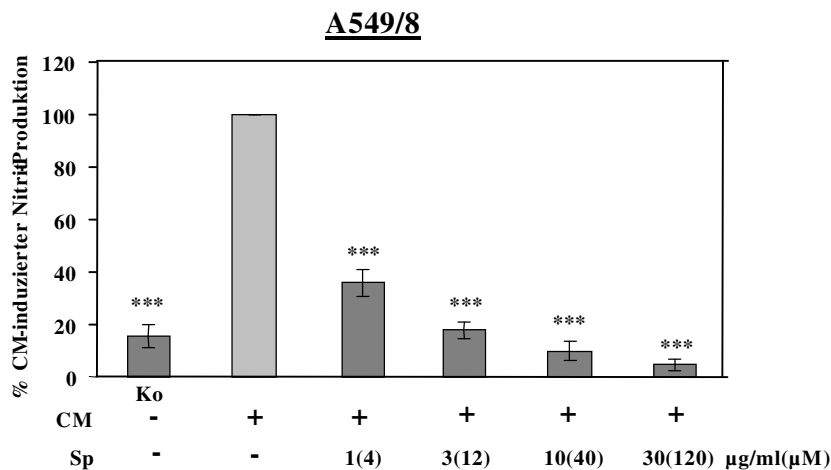
Beziehung zwischen S14-95-Konzentration und iNOS-mRNA-Expression dar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verbindung keinen Einfluss auf die basale iNOS-Expression aufweist (nicht dargestellt). **B:** Hemmende konzentrationsabhängige Wirkung des S14-95 auf die induzierte iNOS-mRNA-Expression ermittelt aus mindestens 6 unterschiedlichen RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gelen. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative iNOS-mRNA-Expression verglichen mit Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; \*,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

A: unverdaute Aktin-Sonde; M: Markierte Marker-DNA; N: unverdaute iNOS- Sonde; S14: S14-95-Konzentration; t: t-RNA; Ko: Kontrollzellen.

#### 4.1.4.6 Hemmung der NO-Produktion durch isolierte Wirkstoffe als Indikator für die iNOS-Expression in A549/8-Zellen

##### 4.1.4.6.1 Sporogen-A01

Die Cytokin-induzierte NO-Produktion, die sich in der Anreicherung des Nitritgehaltes im Medium manifestierte, erniedrigte sich deutlich und konzentrationsabhängig nach Sporogen-A01-Behandlung. Die Nitrit-Menge reduzierte sich in höheren Konzentrationen auf das Niveau derer in Überständen nicht Cytokin-behandelter Kontroll-Zellen. Der  $IC_{50}$  lag für die Wirkung des Sporogen-A01 bezogen auf die iNOS-Aktivität bei unter  $0,6 \mu\text{g/ml}$  ( $2,4 \mu\text{M}$ ). Es kam bei  $120 \mu\text{M}$  Sporogen-A01 fast zu einer vollständigen Unterdrückung der iNOS-Aktivität (Abb. 4-31).

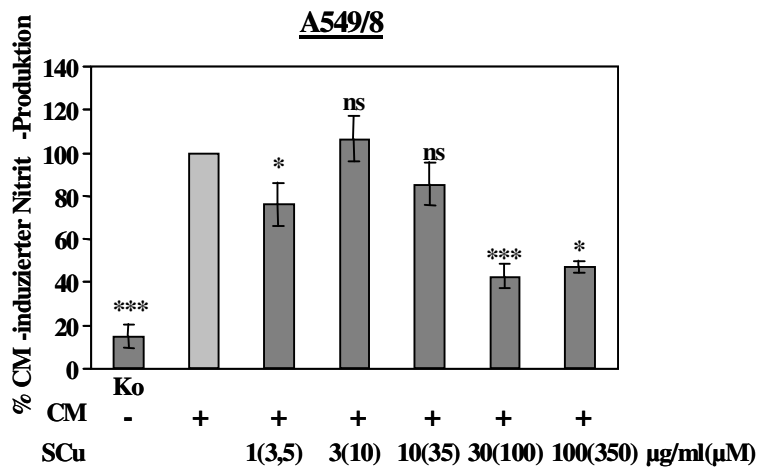


**Abbildung 4-31: Hemmender Einfluss von Sporogen-A01 auf die Cytokin-induzierte NO-Produktion (Griess-Analyse).** Es ist die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zwischen Sporogen-A01-Konzentration (Sp) und NO-Produktion gemessen als Nitrit im Medium dargestellt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verbindung keinen Einfluss auf die basale iNOS-Expression sowie auf den Verlauf der Eichkurven mit reinem Nitrit aufweist (Daten nicht dargestellt). Die A549/8-

Zellen wurden nach 2-stündiger Vorinkubation mit der Substanz 36 h mit einem Cytokin-Gemisch (CM) bestehend aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) sowie TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) induziert und danach die Überstände analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen, die lediglich in Medium ohne FCS und Cytokine inkubiert wurden, verwendet (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative NO-Produktion verglichen mit Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM.

#### 4.1.4.6.2 S-Curvularin

Die Cytokin-induzierte NO-Produktion, die sich in der Anreicherung des Nitritgehaltes im Medium manifestierte, erniedrigte sich konzentrationsabhängig nach S-Curvularin-Behandlung.



**Abbildung 4-32: Inhibitorischer Einfluss von S-Curvularin auf die Cytokin-induzierte NO-Produktion (Griess-Analyse).** Es wird die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zwischen S-Curvularin-Konzentration (SCu) und NO-Produktion gemessen als Nitrit im Medium gezeigt. Die A549/8-Zellen wurden nach 2-stündiger Vorinkubation mit der Substanz 36 h mit einem Cytokin-Gemisch (CM), bestehend aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) sowie TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), induziert und

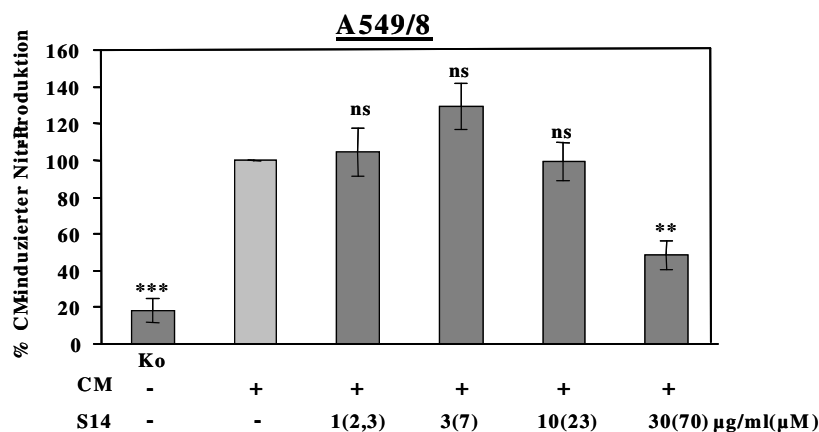
danach die Überstände auf ihren Nitritgehalt hin analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen, die lediglich in Medium ohne FCS und Cytokine inkubiert wurden, verwendet (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative NO-Produktion verglichen mit Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; \*,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.



Die Nitrit-Menge verringerte sich in höheren Konzentrationen in Überständen nicht Cytokin-behandelter A549/8-Zellen, jedoch weniger stark im Vergleich zu Sporogen-A01. Der  $IC_{50}$  liegt für S-Curvularin bezogen auf die iNOS-Aktivität bei 19,7  $\mu\text{g/ml}$  (67,5  $\mu\text{M}$ ).

#### 5.1.2.2.1 S14-95

Der Nitrit-Gehalt des Mediums nahm auch während der S14-95-Behandlung Cytokin-induzierter humaner A549/8-Zellen ab (Abbildung 4-33), jedoch auch weniger stark im Vergleich zu Sporogen-A01-behandelten Zellen. Der  $IC_{50}$  lag für S-14-95 bezogen auf die iNOS-Aktivität bei 24,5  $\mu\text{g/ml}$  (56  $\mu\text{M}$ ).



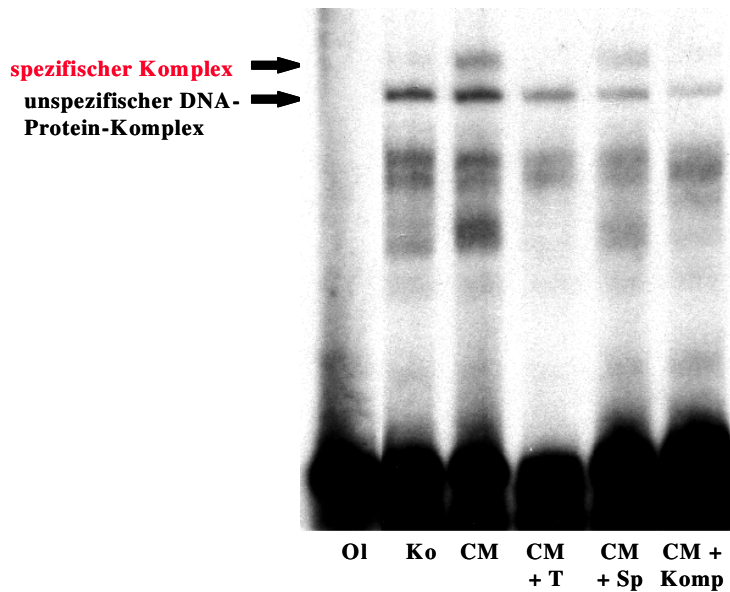
**Abbildung 4-33: Hemmender Einfluss von S-14-95 auf die Cytokin-induzierte NO-Produktion (Griess-Analyse).** Es wird die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zwischen S14-95-Konzentration (S14) und NO-Produktion gemessen als Nitrit im Medium gezeigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verbindung keinen Einfluss auf die basale iNOS-Expression sowie auf den Verlauf der Eichkurven mit reinem Nitrit

aufweist (Daten nicht dargestellt). Die A549/8-Zellen wurden nach 2-stündiger Vorinkubation mit der Substanz 36 h mit einem die Cytokine  $IFN-\gamma$  (100 U/ml),  $IL-1\beta$  (50 U/ml) und  $TNF-\alpha$  (10 ng/ml) enthaltenden Gemisch (CM) induziert und danach die Überstände analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen, die lediglich in Medium ohne FCS und Cytokine inkubiert wurden, verwendet (Ko). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative NO-Produktion verglichen mit Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; \*\*,  $P < 0,01$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

#### 4.1.4.7 Abhängigkeit der iNOS-Expression von der STAT-1 $\alpha$ -Aktivierung in A549/8-Zellen - Inhibition durch Sporogen-A01

In Gelretentionsanalysen zur Bindung der STAT-1 $\alpha$ -Faktoren an GAS-Konsensus-Oligonukleotide ergab sich für Kernextrakte aus Sporogen-A01-behandelten Cytokin-

induzierten A549/8-Zellen eine Verringerung der STAT-1 $\alpha$ -Bindungsaktivität. Diese war nicht so vollständig wie die, die durch Einsatz des Tyrosinkinase-Inhibitors Tyrphostin B42 (200  $\mu$ M) erreicht werden konnte. Allerdings ließ mit 10  $\mu$ g/ml (40  $\mu$ M) der Substanz eine deutliche Verminderung der STAT-1 $\alpha$ -Bindung erreichen.



**Abbildung 4-34: Inhibitorische Wirkung von Sporogen-A01 auf die Bindung von STAT-1 $\alpha$  an GAS-Konsensus-Bindestellen im Zellkern (Gelretentionsanalyse).** Repräsentatives Gelretentionsanalyse-Gel. Es wird die Verringerung der STAT-1 $\alpha$ -Bindung durch Sporogen-A01 (10  $\mu$ g/ml) im Vergleich zur Wirkung von Tyrphostin B42 (200  $\mu$ M) als klassischer Hemmstoff der JAK-STAT-Signaltransduktionskaskade gezeigt. A549/8-Zellen wurden nach 2-stündiger Vorinkubation mit der Substanz 30 min mit Cytokin-Gemisch (IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)) induziert und danach das nukleäre Protein isoliert und davon jeweils 10  $\mu$ g (außer bei Ol) eingesetzt.

Ko: Kontrollzellen; CM: Cytokin-Gemisch; Ol: Oligonukleotid allein; T: Tyrphostin B42; Sp: Sporogen-A01; Komp: Zusatz der 100-fachen Menge an kaltem Oligonukleotid.

## **4.2 Effekte der kleinen G-Proteine der Rho-Familie auf die Expression der induzierbaren NO-Synthase in murinen und humanen Zelllinien**

### **4.2.1 Verstärkung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression in DLD1-, A549/8- und Balb 3T3-Zellen durch direkte und indirekte Rho-Inhibitoren**

Der Einfluss der Statine auf die iNOS-mRNA-Expression wurde in den humanen Zelllinien A549/8 (Alveolarepithel-Karzinomzellen) und DLD1 (Kolon-Karzinom-Zellen) sowie der murinen Fibroblasten-Zelllinie Balb 3T3 mittels RNase-Verdauungsschutzanalyse unter Verwendung radioaktiv markierter Antisense-RNA-Sonden gegen humane iNOS- und  $\beta$ -Aktin-mRNA (zur Normalisierung) näher untersucht.

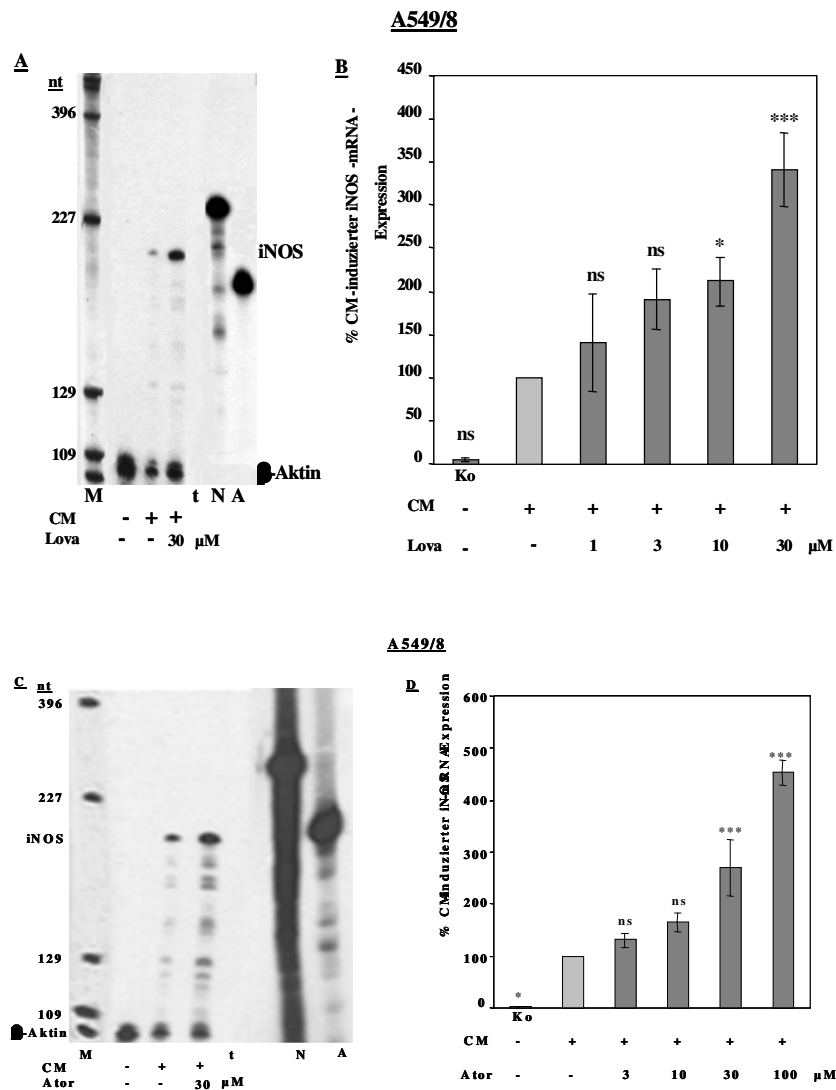
#### **4.2.1.1 Verstärkender Einfluss der Statine auf die humane sowie die murine iNOS-mRNA-Expression**

Kontrollzellen, die 24 bzw. 26 h mit Serum-freiem Medium inkubiert wurden, das weder Statine noch Cytokine enthielt, zeigten erwartungsgemäß keine iNOS-mRNA-Expression, da die induzierbare NO-Synthase kein konstitutiv exprimiertes Enzym darstellt (jeweils 1. Spur in den Autoradiogrammen Abb. 4-35 (A+C) bzw. Abb. 4-36 (A+C)). Detektierbare Mengen an iNOS-mRNA entstanden jedoch, wenn nach 18-stündiger Vorinkubation mit Serum-freiem Medium ein Cytokin-Gemisch, bestehend aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), zugesetzt wurde und die Gesamt-RNA nach weiteren 6 (DLD1) bzw. 8 (A549/8) Stunden isoliert wurde (jeweils 2. Spur in den Autoradiogrammen der Abb. 4-35 (A + C)). Wie Abb. 4-35 bis Abb. 4-36 (jeweils A + C) verdeutlichen, konnte die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in Anwesenheit von Atorvastatin oder Lovastatin in den untersuchten Zelllinien konzentrationsabhängig gesteigert werden. Die Abb. 4-35 und Abb. 4-36 (jeweils B + D) dargestellten Histogramme zeigen den relativen iNOS-mRNA-Gehalt bezogen auf die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in unbehandelten Zellen, jeweils normiert auf die Menge an konstitutiv exprimierter  $\beta$ -Aktin-mRNA. Bei 10  $\mu$ M Atorvastatin oder Lovastatin fand man relativ einheitlich über alle zwei humanen Zelllinien hinweg eine 1,5- bis 2-fach erhöhte Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression. Eine Steigerung auf das 2,5- bis 4-fache konnte in Anwesen-

heit von 30  $\mu\text{M}$  Statin beobachtet werden. Eine Konzentrationserhöhung auf 100  $\mu\text{M}$  konnte die iNOS-mRNA-Expression zum Teil noch einmal erheblich steigern. Da jedoch gleichzeitig morphologische Veränderungen, insbesondere der A549/8-Zellen, auf eine beginnende Zytotoxizität hinwiesen, wurde für die Untersuchung der Aufhebbarkeit der Statin-Effekte durch Zwischenprodukte der Cholesterinbiosynthese eine Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  als - sicher wirksam, aber noch nicht toxisch - angenommen. In Abwesenheit des Cytokin-Gemisches konnte weder Atorvastatin noch Lovastatin eine Expression der iNOS-mRNA induzieren. Die Superinduktion der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression durch Lovastatin trat auch auf, wenn der Laktonring nicht zuvor durch alkalische Hydrolyse *in vitro* geöffnet worden war (Daten nicht gezeigt). Die Effekte des Cholesterinsenkers Lovastatin wurde nach dessen Aktivierung durch Hydrierung des Laktonringes durch direkte Einwirkung auf die Zellen, die diesen nach Hydroxylierung aufnehmen untersucht. Atorvastatin wurde nicht wie das verwandte Lovastatin durch alkalische Hydrolyse aktiviert, sondern es lag in wässrigem Medium bereits als Lakton vor. Außerdem ergab sich für die Statine eine zwischen 2,5- und 4-fach erhöhte iNOS-Induktionsrate gegenüber der Kontrollzell-mRNA in murinen Balb 3T3-Fibroblasten, die als Mausmodell-Zelllinie eingesetzt wurden.

#### **4.2.1.1.1 Statine verstärken die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen**

Lovastatin erhöhte konzentrationsabhängig die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen. Dabei konnte Lovastatin in Abwesenheit von Cytokinen die iNOS-mRNA-Expression jedoch nicht induzieren (Abb. 4-35, A + B). Nach Behandlung Cytokin-induzierter A549/8-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Atorvastatin, einem weiteren HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, ließ sich eine mehr als 4fach gesteigerte iNOS-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle (CM) feststellen (Abb. 4-35, C + D).



**Abbildung 4-35: Einfluss der Statine auf die mRNA-Expression der induzierbaren NO-Synthase in Cytokin-induzierten A549/8-Zellen.** Ohne gleichzeitige Behandlung mit Cytokinen zeigte sich keine Statin-induzierte iNOS-mRNA-Expression. Nach 18-stündiger Vorinkubation mit Serumfreiem Medium unter Anwesenheit der entsprechenden Statin-Konzentration wurden humane A549/8-Zellen für weitere 8 h vor Isolation der Gesamt-RNA die iNOS-mRNA-Expression durch Zusatz eines aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bestehenden Cytokin-Gemisches (CM) unter Anwesenheit der entsprechenden Statin-Konzentration induziert. **A, C:** Gezeigt ist ein repräsentatives RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gel aus einer Gesamtheit von 3 Gelen. **B, D:** Densitometrische Auswertung 3er bzw. 4er unabhängiger RNase-Verdauungsschutzana-

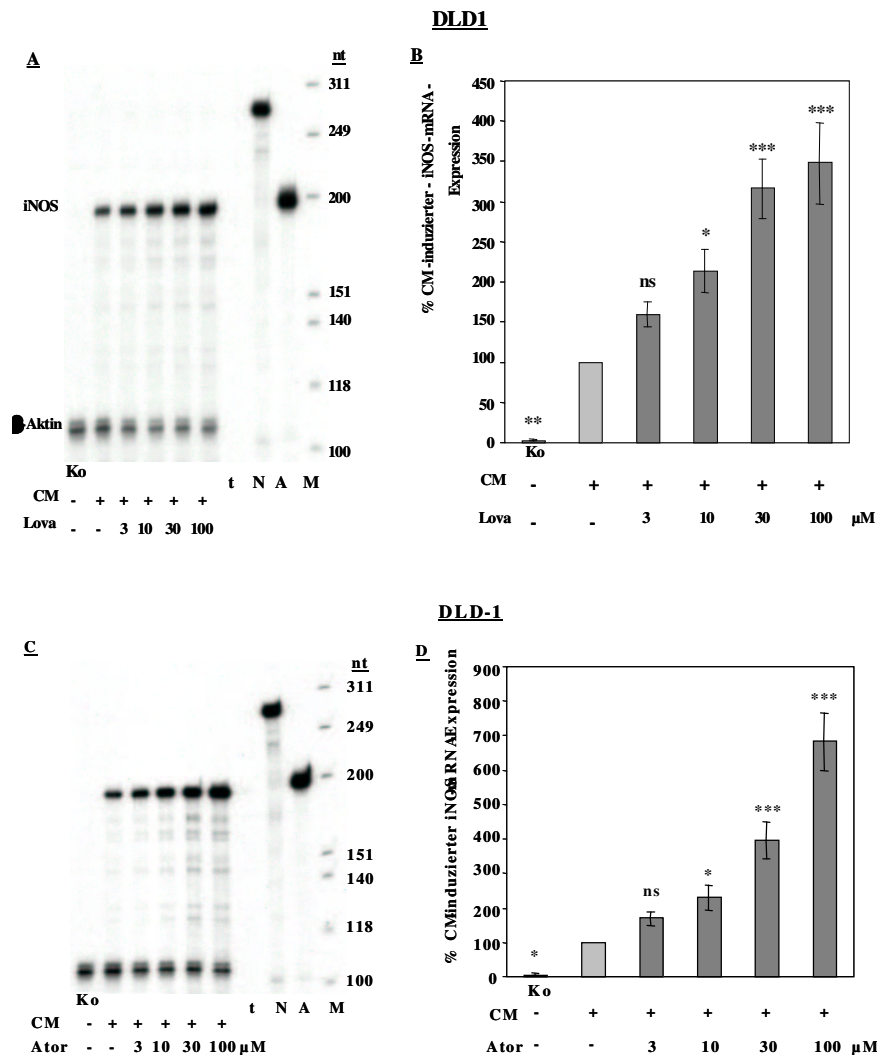
lysen mit radioaktiv-markierten Antisense-RNA-Sonden gegen humane iNOS- und  $\beta$ -Aktin-mRNA (zur Normalisierung). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relativen iNOS-mRNA-Mengen bezogen auf den iNOS-mRNA-Gehalt in unbehandelten Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; \*,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

Ko: Kontrollzellen; Lova: Lovastatin-Konzentration; Ator: Atorvastatin-Konzentration; t: t-RNA; N: unverdaute humane iNOS-Antisense-Sonde; A: unverdaute humane  $\beta$ -Aktin-Antisense-Sonde; M: Molekulargewichts-Marker, pGL<sub>2</sub>-Basic geschnitten mit *HinfI*.

#### 4.2.1.1.2 Statine verstärken die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in DLD1-Zellen

Ebenso wie in A549/8-Zellen konnten die Statine auch in DLD1-Zellen die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression konzentrationsabhängig erhöhen. In dieser Zelllinie konnte Lovastatin in

Abwesenheit von Cytokinen die iNOS-mRNA-Expression ebenfalls nicht induzieren (Abbildung 4-36). Auch in Cytokin-induzierten DLD1-Zellen führt Atorvastatin zu einer mehr als 6-fach gesteigerten iNOS-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle (CM).



**Abbildung 4-36: Einfluss der Statine auf die mRNA-Expression der induzierbaren NO-Synthase in Cytokin-induzierten DLD1-Zellen.** Ohne gleichzeitige Behandlung mit Cytokinen zeigte sich keine Statin-induzierte iNOS-Expression (Daten nicht gezeigt). Nach 18-stündiger Vorinkubation mit Serumfreiem Medium unter Anwesenheit der entsprechenden Statinkonzentration wurden humane DLD1-Zellen für weitere 6 h vor Isolation der Gesamt-RNA die iNOS-mRNA-Expression durch Zusatz eines aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bestehenden Cytokin-Gemisches (CM) unter Anwesenheit der entsprechenden Statinkonzentration induziert. A, C: Gezeigt ist ein repräsentatives RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gel aus einer Gesamtheit von 3

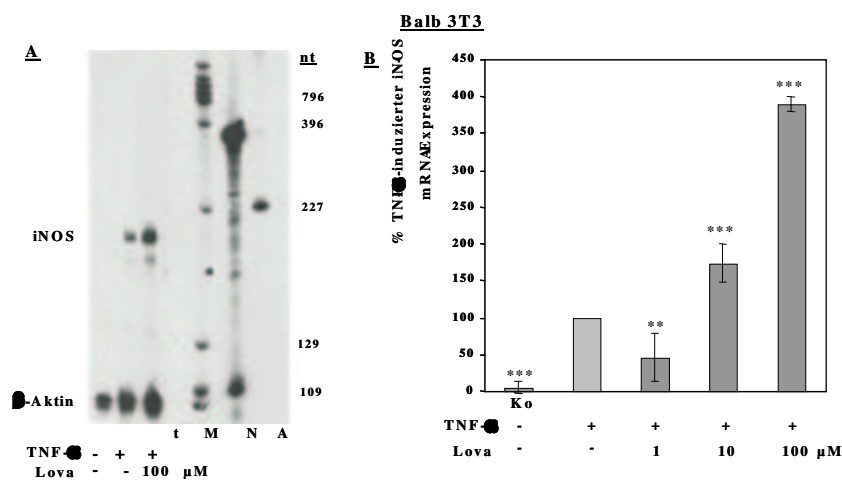
Gelen. B, D: Densitometrische Auswertung 3er unabhängiger RNase-Verdauungsschutzanalysen mit radioaktiv-markierten Antisense-RNA-Sonden gegen humane iNOS- und  $\beta$ -Aktin-mRNA (zur Normalisierung). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relativen iNOS-mRNA-Mengen bezogen auf den iNOS-mRNA-Gehalt in unbehandelten Zellen nach Induktion mit dem aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bestehenden Cytokin-Gemisch (CM). \*,  $P < 0,05$  vs CM; \*\*,  $P < 0,01$  vs CM; \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

Ko: Kontrollzellen; Lova: Lovastatin -Konzentration; t: t-RNA; N: unverdaute humane iNOS-Antisense-Sonde; A: unverdaute humane  $\beta$ -Aktin-Antisense-Sonde; M: Molekulargewichts-Marker,  $\Phi$ X174 geschnitten mit *HinfI*.

Ein Effekt von Atorvastatin auf die basale iNOS-mRNA-Expression wurde gleichermaßen nicht festgestellt.

#### 4.2.1.1.3 Statine verstärken die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in murinen Balb 3T3-Zellen

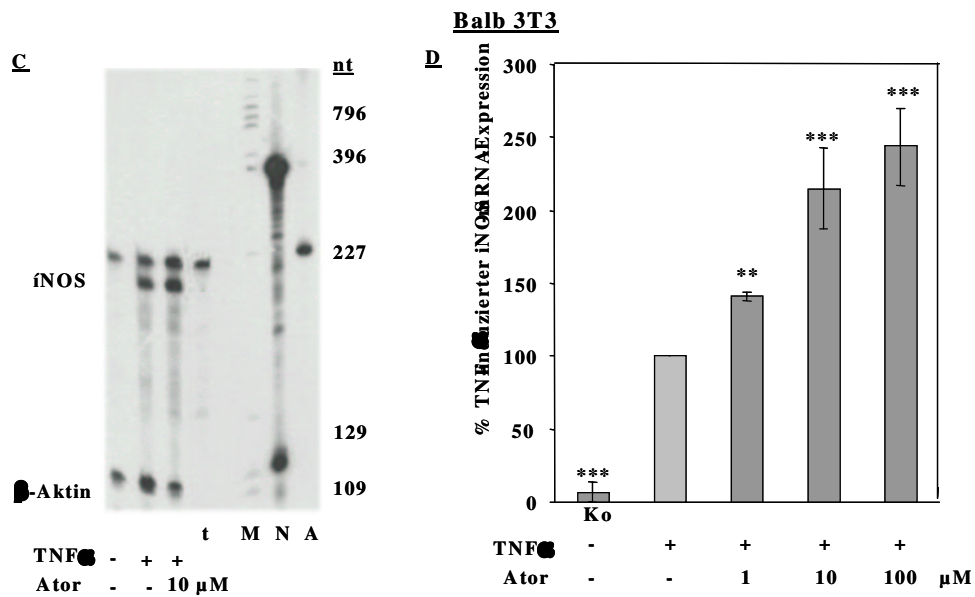
Auch in murinen Balb 3T3-Zellen war Lovastatin in der Lage, die TNF- $\alpha$ -induzierte iNOS-mRNA-Expression zu erhöhen. Dabei konnte Lovastatin in Abwesenheit von TNF- $\alpha$  die iNOS-mRNA-Expression jedoch nicht induzieren. Es ergab sich für dieses Statin eine maximal 4-fach erhöhte iNOS-Induktionsrate gegenüber der Kontrollzell-mRNA in den murinen Fibroblasten, die als Mausmodell-Zelllinie eingesetzt wurden (Abbildung 4-37, A + B). In Balb 3T3-Zellen, die mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  induziert wurden, konnte Atorvastatin ebenfalls die iNOS-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle (TNF- $\alpha$ ) um das 2,5-fache steigern (Abbildung 4-37, C +D). Es scheint im Gegensatz zu den untersuchten humanen Zelllinien in der murinen Zelllinie weniger potent zu sein als Lovastatin. Ein Effekt von Atorvastatin auf die basale murine iNOS-mRNA-Expression wurde ebenfalls nicht festgestellt (nicht gezeigt).



**Abbildung 4-37: Einfluss der Statine auf die mRNA-Expression der induzierbaren NO-Synthase in TNF- $\alpha$ -induzierten Balb 3T3-Zellen.** Ohne TNF- $\alpha$ -Behandlung zeigte sich keine iNOS-Expression. Nach 18-stündiger Vorinkubation mit Medium mit 0,5 % FCS unter Anwesenheit der entsprechenden Lovastatin-Konzentration wurden murine Balb 3T3-Zellen für weitere 8 h vor Isolierung der Gesamt-RNA die iNOS-mRNA-

Expression durch Zusatz von TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) unter Anwesenheit der entsprechenden Lovastatin-Konzentration induziert. A, C (siehe S. 120): Gezeigt ist ein repräsentatives RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gel aus einer Gesamtheit von 3 Gelen. B, D (siehe S. 120): Densitometrische Auswertung 3er unabhängiger RNase-Verdauungsschutzanalysen mit radioaktiv-markierten Antisense-RNA-Sonden gegen murine iNOS- und  $\beta$ -Aktin-mRNA (zur Normalisierung). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relativen iNOS-mRNA-Mengen bezogen auf den iNOS-mRNA-Gehalt in unbehandelten Zellen nach Induktion mit TNF- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs TNF $\alpha$ ; \*\*,  $P < 0,01$  vs TNF $\alpha$ .

Ko: Kontrollzellen; Lova: Lovastatin-Konzentration; Ator: Atorvastatin-Konzentration; t: t-RNA; N: unverdaute humane iNOS-Antisense-Sonde; L: unverdaute Luziferase-Antisense-Sonde; A: unverdaute humane  $\beta$ -Aktin-Antisense-Sonde; M: Molekulargewichts-Marker,  $\Phi$ X174 geschnitten mit *Hinf*I.

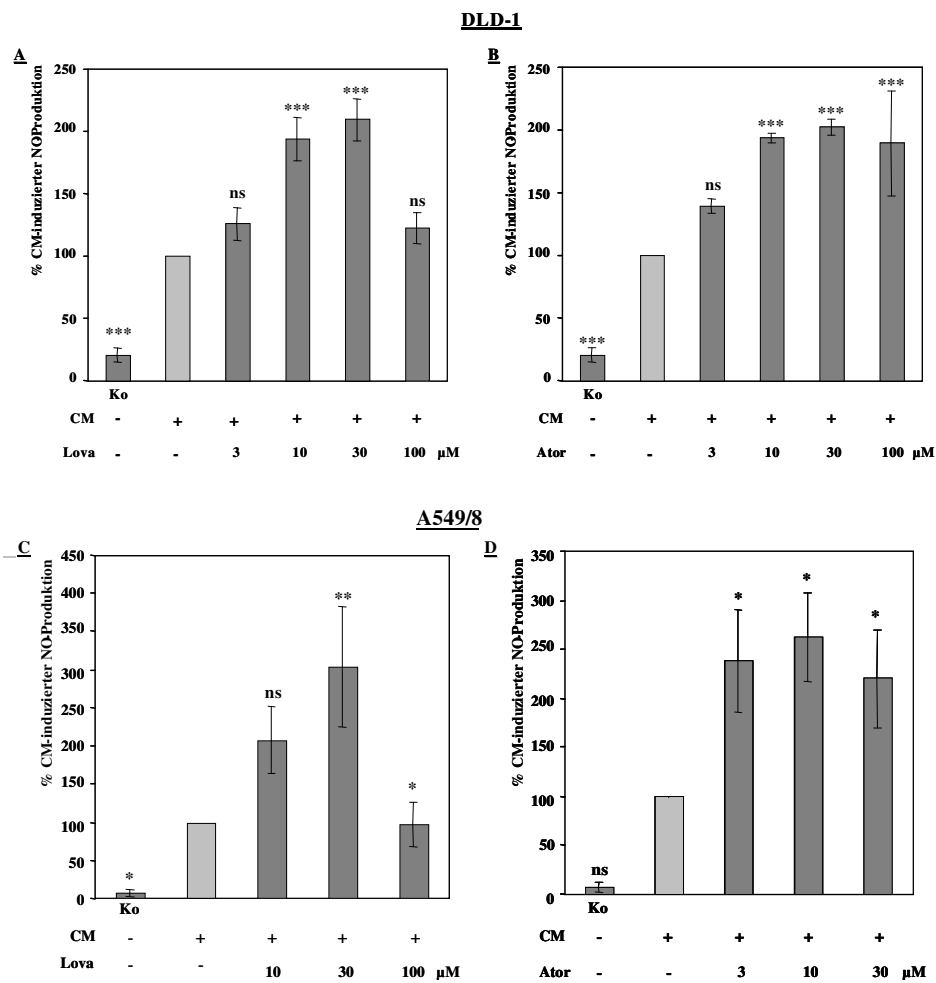


#### 4.2.1.2 Einfluss von Lovastatin und Atorvastatin auf die Cytokin-induzierte Nitrit-Produktion als Maß für die iNOS-Aktivität in humanen Zellen

Als ein Maß für die NO-Produktion durch die iNOS wurde mittels Griess-Analyse im Überstand die Konzentration des stabilen NO-Abbauprodukts Nitrit ermittelt, das während 24 h nach Zusatz des Cytokin-Gemisches akkumulieren konnte.

Enthielt das Serum-freie Medium während der 18-stündigen Vorinkubation und der anschließenden 24-stündigen Induktion mit dem Cytokin-Gemisch 30  $\mu$ M Atorvastatin oder Lovastatin, so erzielte man sowohl in DLD1- als auch in A549/8-Zellen eine Verdopplung bis Verdreifachung der NO-Produktion (Abb. 4-38).





**Abbildung 4-38:** Steigerung der Cytokin-induzierten NO-Produktion in DLD1- (A, B) und in A549/8-Zellen (C, D) durch Atorvastatin und Lovastatin (Griess-Analyse). Nach 18-stündiger Vorinkubation mit Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von Atorvastatin bzw. Lovastatin wurde in humanen DLD1-Zellen durch Zusatz eines aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bestehenden Cytokin-Gemisches (CM) die iNOS-Expression induziert und nach weiteren 24 h mittels Griess-Analyse die im Überstand akkumulierte Nitrit-Menge als Maß für die NO-Produktion bestimmt. Kontroll-

Zellen (Ko) wurden 42 h mit Serum-freiem Medium inkubiert, das weder Statine noch Cytokine enthielt. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) entsprechen der Auswertung von 4 unabhängigen Analysen und repräsentieren die relative NO-Produktion bei den verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Statins bezogen auf die NO-Produktion in unbehandelten Zellen - jeweils nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch. \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; \*\*,  $P < 0,01$  vs CM; \*,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

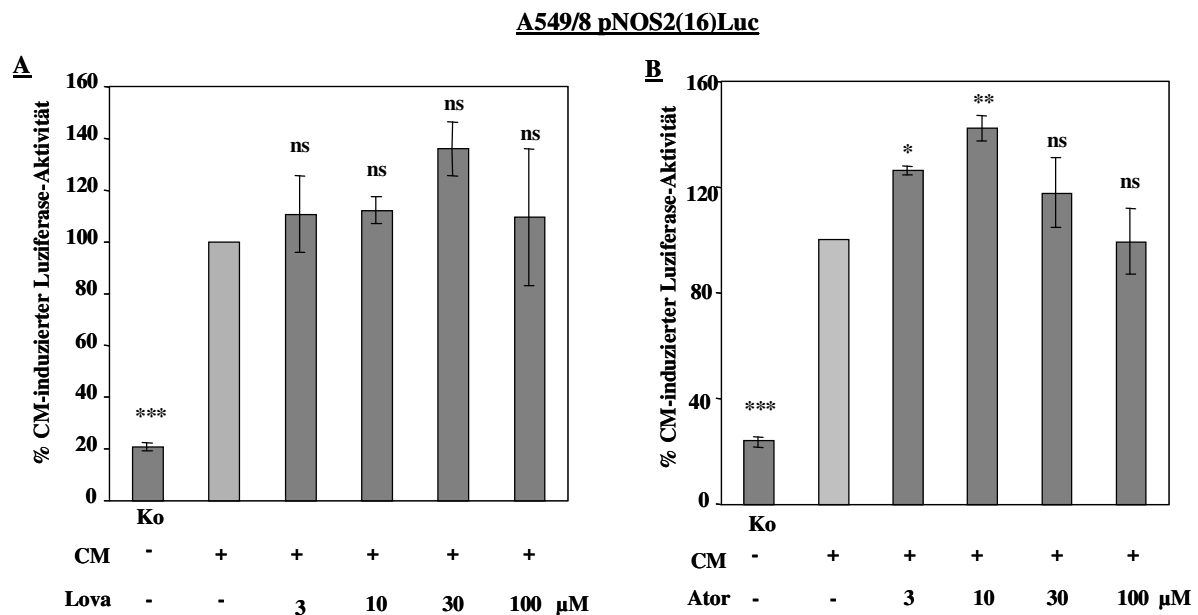
Lova: Lovastatin; Ator: Atorvastatin-Konzentration.

#### **4.2.1.3 Erhöhung der Cytokin-induzierten iNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten DLD1-, jedoch nicht in A549/8-Zellen durch Statine**

Um den Einfluss der beiden Cholesterin-Synthese-Hemmer Atorvastatin und Lovastatin auf die iNOS-Promotoraktivität untersuchen zu können, wurden humane Zellen, die stabil mit einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luziferase-Reportergen transfiziert waren, verwendet. Es wurden mit diesen neben Analysen der Luziferase-Aktivität auch der Luziferase-mRNA-Expression durchgeführt. Die Luziferase-aktivität wurde dabei auf den Proteingehalt der Zellysate und die Luziferase-mRNA-Expression auf den Gehalt an konstitutiv exprimierter humaner  $\beta$ -Aktin-mRNA normiert. Die beiden methodischen Ansätze lieferten vergleichbare Ergebnisse. Stabil transfizierten humane Zellen wurden 18 h mit Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von Statinen vorinkubiert. Die Zellysate Statin-behandelter Zellen, welche 4,5 h nach Zusatz des Cytokin-Gemisches mittels Luziferaseaktivitätsmessung analysiert wurden, wiesen verglichen mit denen unbehandelter Cytokin-induzierter Zellen eine konzentrationsabhängige bis zu 2,5-fach gesteigerte Luziferaseaktivität auf (Abb. 4-39 bzw. Abb. 4-40). 6 h nach Zugabe der Cytokine zum Medium isolierte Gesamt-RNA zeigte bei der Untersuchung durch eine RNase-Verdauungsschutzanalyse mit radioaktiv-markierten Antisense-RNA-Sonden gegen humane iNOS-mRNA, Luziferase-mRNA und gegen humane  $\beta$ -Aktin-mRNA eine Statin-vermittelte parallele Steigerung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA- und Luziferase-mRNA-Expression (Abb. 4-41). Die densitometrische Auswertung mehrerer Gele mit ähnlichem Ergebnis wie in Abb. 4-41 gezeigt, ergab, dass die Cytokin-induzierte Luziferase-Reportergen-mRNA-Expression und damit die Cytokin-induzierte iNOS-Promotoraktivität unter dem Einfluss von Statinen auf mehr als das Doppelte steigerbar ist. Bei Betrachtung der jeweils 1. Spur der in Abb. 4-41 gezeigten Gele, in der die Gesamt-RNA aus Kontroll-Zellen aufgetragen wurde, welche 24 h mit Serum-freiem Medium ohne Zusatz von Statinen und Cytokinen inkubiert worden waren, fällt neben der bereits erwähnten fehlenden iNOS-mRNA-Expression eine Basalexpression der Luziferase-Reportergen-mRNA auf, die einer basalen iNOS-Promotoraktivität entspricht. Abbildung 4-40 zeigt die Ergebnisse von in stabil transfizierten DLD1-Zellen durchgeführten Reportergen-Analysen auf Ebene der Luziferaseaktivität. Atorvastatin und Lovastatin konnten während der 22,5-stündigen Inkubationszeit mit Serum-freiem Medium die basale iNOS-Promo-

toraktivität in Abwesenheit von Cytokinen gegenüber unbehandelten Kontrollzellen nicht wesentlich erhöhen (nicht gezeigt). AKN1-Zellen, die wie die DLD1-Zellen mit dem Konstrukt aus dem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors und dem Luziferase-Reportergen stabil transfiziert worden waren, zeigten in Reporteranalysen auf Ebene der Luziferaseaktivität unter dem Einfluss von Atorvastatin oder Lovastatin ebenfalls eine deutliche, konzentrationsabhängige Erhöhung der Cytokin-induzierten iNOS-Promotoraktivität (nicht gezeigt). Außerdem konnte in den stabil transfizierten AKN1-Zellen auch eine nicht unerhebliche Statin-vermittelte Steigerung der basalen iNOS-Promotoraktivität beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Humane A549/8-Zellen, die in gleicher Weise wie die DLD1- und AKN1-Zellen stabil mit dem Konstrukt aus dem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors und dem Luziferase-Reportergen transfiziert worden waren, wurden ebenfalls für 18 h mit Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von Statinen präinkubiert. Die 4,5 h nach Zusatz des Cytokin-Gemisches als Maß für die Cytokin-induzierte iNOS-Promotoraktivität bestimmte Luziferaseaktivität konnte in stabil transfizierten A549/8-Zellen durch Atorvastatin oder Lovastatin - verglichen mit den anderen beiden humanen Zelllinien - nur in sehr geringem Umfang, nämlich um einen Faktor kleiner 1,5 erhöht werden (Abb. 4-39). Auch die basale iNOS-Promotoraktivität dieser Zellen wurde in Gegenwart der Statine kaum beeinflusst (nicht gezeigt). Die Cytokin-induzierte iNOS-Promotoraktivität in stabilen A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen konnte durch Lovastatin kaum gesteigert werden (Abb. 4-39 (A)). Die um den Faktor 3 geringere Promotor-Aktivität unter Basalbedingungen konnte durch Lovastatin in diesen Zellen kaum gesteigert werden.

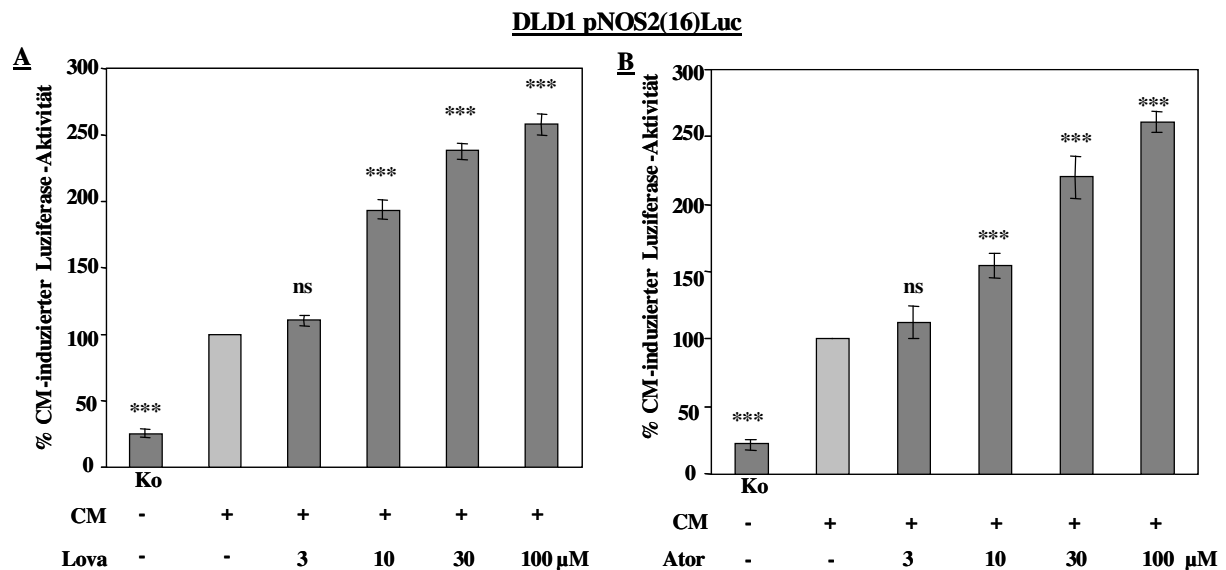
Nach der Cytokin-Induktion des Promotors kam es mit Atorvastatin zu keiner signifikanten Superinduktion der iNOS-Promotor-Aktivität (Abb. 4-39 (B)). Die nicht mit Cytokinen behandelten A549/8pNOS2(16)-Zellen zeigten nur bei der höchsten Atorvastatin-Konzentration von 100  $\mu$ M eine Erhöhung der 3fach niedrigeren basalen iNOS-Promotoraktivität um das 2-fach verglichen mit den übrigen Konzentrationsstufen (nicht gezeigt). Dies spricht für eine unspezifische Erhöhung der Promotoraktivität aufgrund des in dieser Konzentration zytotoxisch wirkenden Statins.



**Abbildung 4-39: Einfluss von Lovastatin (A) und Atorvastatin (B) auf den Promotor der induzierbaren NO-Synthase(16kb) in Cytokin-induzierten A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen, jedoch keine Wirkung auf die geringe basale Promotoraktivität.** Humane A549/8-Zellen wurden stabil mit einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luziferase-Reportergen transfiziert. Die gemessene Luziferaseaktivität normiert auf den Proteingehalt der Zellysate wurde als iNOS-Promotoraktivität angenommen. Nach 18-stündiger Vorinkubation mit Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von Lovastatin wurde dem Medium ein aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bestehendes Cytokin-Gemisch (CM) zugesetzt und nach weiteren 4,5 h die Luziferaseaktivität sowie der Proteingehalt der Zellysate bestimmt. Kontroll-Zellen (Ko) wurden 22,5 h mit Serum-freiem Medium inkubiert, das weder Statine noch Cytokine enthielt. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) entsprechen der Auswertung von 4 unabhängigen Analysen und repräsentieren die relative Luziferaseaktivität bezogen auf die Luziferaseaktivität in CM-behandelten Zellen. \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; \*\*,  $P < 0,01$  vs CM; \*,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

Lova: Lovastatin-Konzentration; Ator: Atorvastatin-Konzentration.

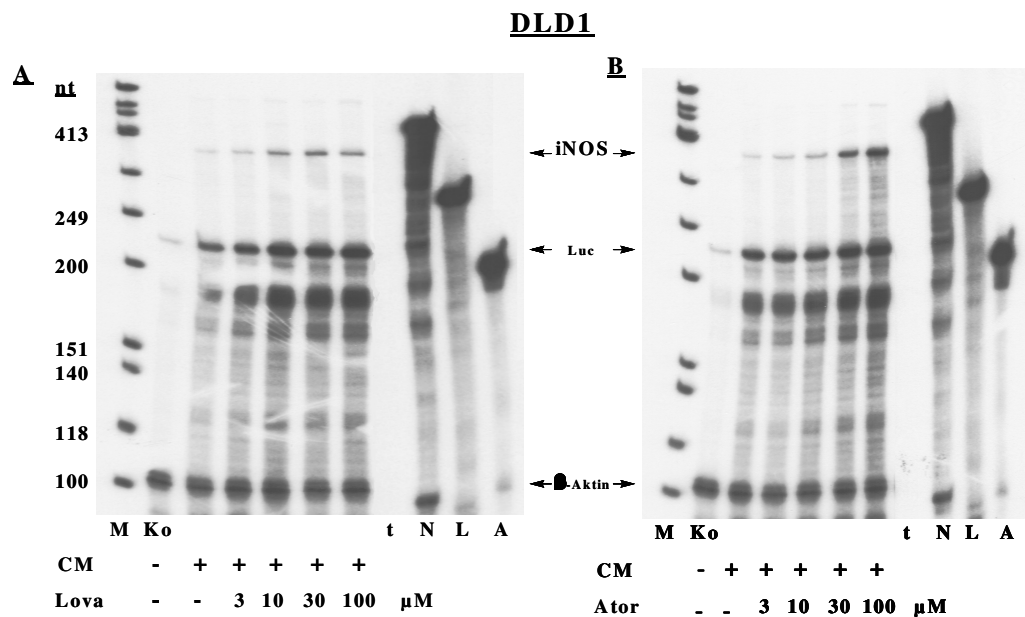
Die Cytokin-induzierte iNOS-Promotoraktivität in stabilen DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen konnte durch Lovastatin um das 2,5-fache in der höchsten eingesetzten Lovastatin-Konzentration (100  $\mu$ M) gesteigert werden (Abb. 4-40 (A)). Die um den Faktor 4 geringere Promotoraktivität unter Basalbedingungen konnte jedoch durch Lovastatin in diesen Zellen kaum gesteigert werden.



**Abbildung 4-40: Superinduktion des Promotors der induzierbaren NO-Synthase (16kb) in Cytokin-induzierten DLD1-Zellen durch Lovastatin(A) und Atorvastatin (B), jedoch keine Wirkung ohne gleichzeitige Cytokin-Induktion (Luziferase-Reportergenanalyse mittels Luziferaseaktivitätsmessung).** Humane DLD1-Zellen wurden stabil mit einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luziferase-Reporter gen transfiziert. Die gemessene Luziferaseaktivität normiert auf den Proteingehalt der Zellysate wurde als iNOS-Promotoraktivität angenommen. Nach 18-stündiger Vorinkubation mit Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von Lovastatin wurde dem Medium ein aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bestehendes Cytokin-Gemisch (CM) zugesetzt und nach weiteren 4,5 h die Luziferaseaktivität sowie der Proteingehalt der Zellysate bestimmt. Kontroll-Zellen (Ko) wurden 22,5 h mit Serum-freiem Medium inkubiert, das weder Statine noch Cytokine enthielt. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) entsprechen der Auswertung von 4 unabhängigen Analysen und repräsentieren die relative Luziferaseaktivität bei den angegebenen Konzentrationen bezogen auf die Luziferaseaktivität in unbehandelten Zellen - jeweils nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch oder ohne Induktion. \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

Lova: Lovastatin-Konzentration; Atorvastatin-Konzentration.

Nach Cytokin-Induktion des Promotors kommt es durch beide Statine in den DLD1 pNOS2(16)Luc-Zellen zu einer Superinduktion der iNOS-Promotor-Aktivität, dargestellt als Luziferase-Signale im Vergleich zur damit einhergehenden Erhöhung der iNOS-mRNA-Expression (Abb. 4-41 (A und B)).



**Abbildung 4-41: Erhöhung der Cytokin-induzierten iNOS-Promotoraktivität in DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen durch Atorvastatin und Lovastatin** (Luziferase-Reporterergenanalyse mittels RNase-Verdauungsschutzanalyse). Stabil mit einem 16 kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luziferase-Reporter gen transfizierte humane DLD1-Zellen wurden 18 h mit Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von Atorvastatin bzw. Lovastatin präinkubiert. 6 h nach Zugabe des Cytokin-Gemisches (CM) zum Medium, wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels RNase-Verdauungsschutzanalyse untersucht. Kontroll-Zellen (Ko) wurden 24 h mit Serum-freiem Medium inkubiert, das weder Statine, noch Cytokine enthält. Die auf den Gehalt an konstitutiv exprimierter  $\beta$ -Aktin-mRNA normierte Luziferase-mRNA-Expression wurde als ein Maß für die iNOS-Promotoraktivität angenommen. Zu sehen sind repräsentative RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gele, bei der pro Spur 30  $\mu$ g der aus den stabil transfizierten DLD1-Zellen isolierten Gesamt-RNA unter Verwendung radioaktiv-markierter Antisense-RNA-Sonden gegen humane iNOS- und  $\beta$ -Aktin-mRNA (zur Normalisierung) sowie gegen Luziferase-mRNA untersucht wurden. Die Abbildung zeigt für die Behandlung mit Atorvastatin (B) und Lovastatin (A) jeweils ein repräsentatives Autoradiogramm.

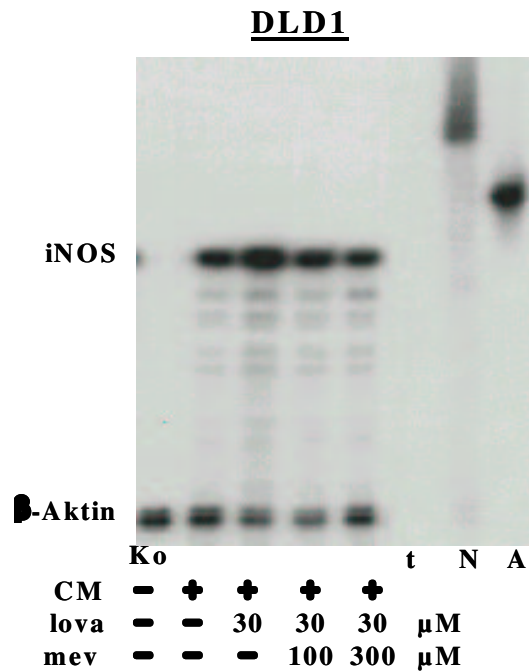
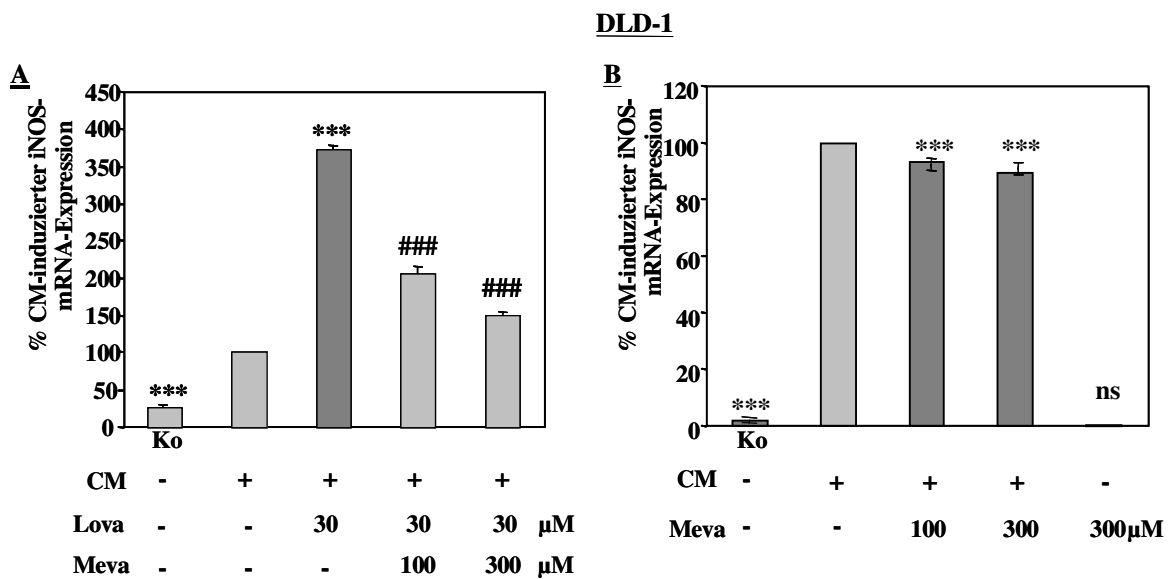
Ko: Kontrollzellen; t: t-RNA; N: unverdaute humane iNOS-Antisense-Sonde; L: unverdaute Luziferase-Antisense-Sonde; A: unverdaute humane  $\beta$ -Aktin-Antisense-Sonde; M: Molekulargewichts-Marker,  $\Phi$ X174 geschnitten mit *Hinf*I.

#### **4.2.2 Wiederaufhebbarkeit der Statin-vermittelten Superinduktion der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression durch Mevalonat in DLD1-Zellen**

Unter der Fragestellung, ob die Statin-vermittelte Superinduktion der iNOS-mRNA-Expression durch Mevalonat, dem Produkt der  $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase-Reaktion, aufhebbar ist, wurde die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in humanen DLD1-Zellen untersucht, die 26 h lediglich mit 30  $\mu$ M Lovastatin behandelt wurden und mit der in Zellen verglichen, deren Medium während der letzten 6 h der Inkubationszeit zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen an Mevalonat enthielt.

Die Auswertung der in Abb. 4-42 (C) gezeigten RNase-Verdauungsschutzanalyse mit radioaktiv-markierten Antisense-RNA-Sonden gegen humane iNOS- und  $\beta$ -Aktin-mRNA (zur Normalisierung) ergaben, dass unter dem Einfluss von 30  $\mu$ M Lovastatin beobachtete Verdopplung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression bei gleichzeitiger Anwesenheit von Mevalonat im Medium in konzentrationsabhängiger Weise reduziert werden konnte (Abb. 4-42 (A + C)). Bei einer Mevalonat-Konzentration von 300  $\mu$ M war die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression nicht mehr signifikant verschieden von der unbehandelten Zellen, die Effekte des Statins somit vollständig aufgehoben (Abb. 4-42 (A)).

In Abwesenheit von Lovastatin hatte Mevalonat keinen Einfluss auf die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression. Ebenso blieb die iNOS-mRNA-Expression in nicht durch Cytokine induzierten Kontrollzellen durch Mevalonat unbeeinflusst (Abb. 4-42 (B)).



**Abbildung 4-42: Wiederaufhebbarkeit der Statin-vermittelten Superinduktion der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression durch Mevalonat in DLD1-Zellen.** Humane DLD1-Zellen wurden 18 h mit Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von 30 µM Lovastatin vorinkubiert. Bei einem anschließenden Mediumwechsel erhielt der eine Teil der Zellen, die zuvor mit 30 µM Lovastatin behandelt worden waren, erneut Medium mit 30 µM Lovastatin, während der andere Teil der Zellen einer Kombination aus Lovastatin und Mevalonat ausgesetzt wurde. 2 h später wurde durch Zugabe eines aus IFN-γ (100 U/ml), IL-1β (50 U/ml) und TNF-α (10 ng/ml) bestehenden Cytokin-Gemisches (CM) die iNOS-Expression induziert und nach weiteren 6 h die Gesamt-RNA isoliert. Kontroll-Zellen (Ko) wurden 26 h mit Serum-freiem Medium inkubiert, das weder Statine noch Mevalonat oder Cytokine enthielt. **A:** Aufhebung der Lovastatin-bedingten Superinduktion der iNOS-mRNA-Expression durch Mevalonat. **B:** Kein Einfluss von

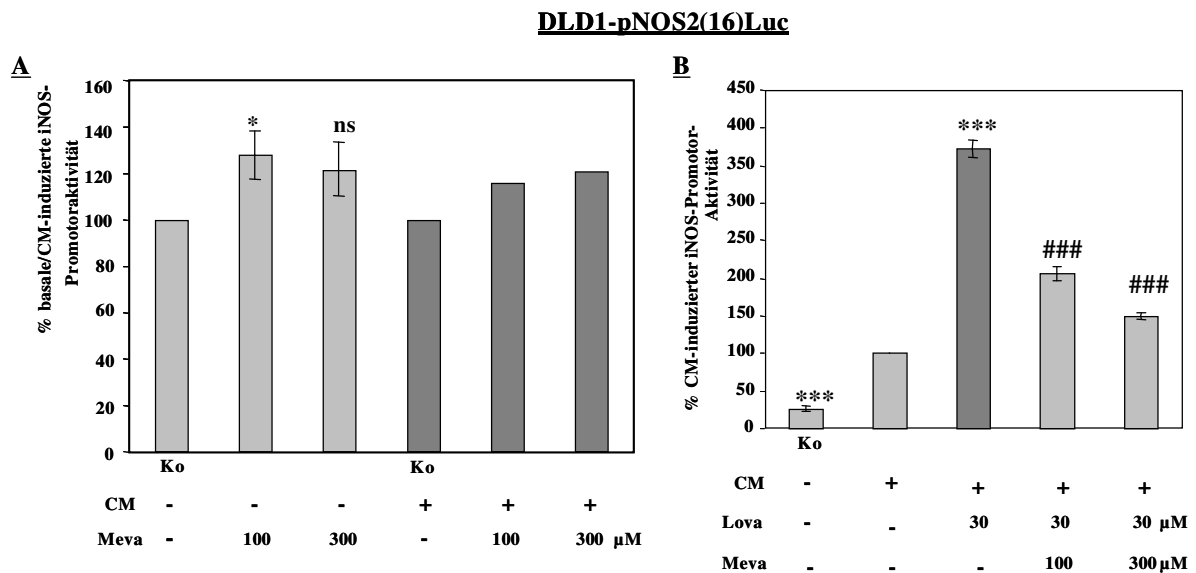
Mevalonat alleine auf die iNOS-mRNA-Expression. **C:** Repräsentatives RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gel. Die Säulen (Mittelwert ± SEM) repräsentieren die relativen iNOS-mRNA-Mengen bezogen auf den iNOS-mRNA-Gehalt in unbehandelten Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; ###,  $P < 0,001$  vs CM mit 30 µM Lovastatin; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

Lova: Lovastatin; Meva: Mevalonat; t: t-RNA; N: unverdaute iNOS-Sonde; A: unverdaute β-Aktin-Sonde.



#### 4.2.3 Wiederaufhebbarkeit der Lovastatin-bedingten Superinduktion der Cytokin-induzierten iNOS-Promotoraktivität in DLD1 pNOS2(16)Luc-Zellen durch Mevalonat

Die Aufhebung der Lovastatin-Effekte auf die iNOS-mRNA-Expression durch Mevalonat spiegelte sich auch in der Beeinflussung der Lovastatin-bedingten Superinduktion der Cytokin-induzierten iNOS-Promotoraktivität durch Mevalonat wieder (Abb. 4-43 (A)). Die Cytokin-induzierte iNOS-Promotoraktivität blieb durch Mevalonat alleine unbeeinflusst (Abb. 4-43 (B)).

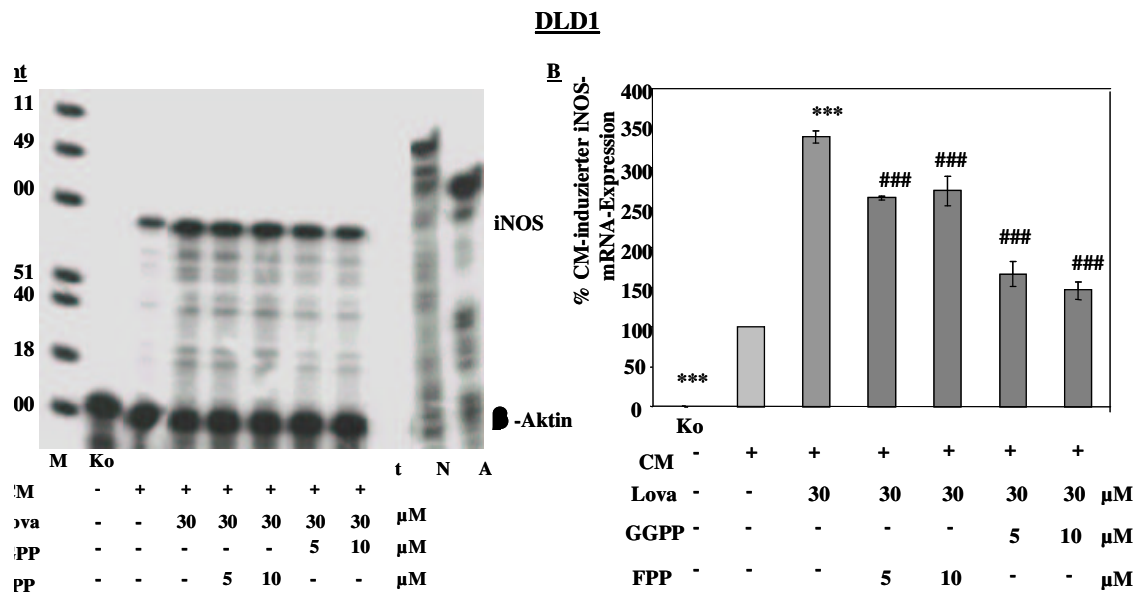


**Abbildung 4-43: Aufhebende Wirkung von Mevalonat auf die Lovastatin-superinduzierte Aktivität des iNOS-Promotors in Cytokin-induzierten DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen (A).** Es zeigte sich kein direkter Einfluss von Mevalonat auf die basale Promotoraktivität (B). Stabil mit einem 16kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luziferase-Reporter gen transfizierte humane DLD1-Zellen wurden 18 h mit Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von 30  $\mu$ M Lovastatin vorinkubiert. Bei einem anschließenden Mediumwechsel erhielt der eine Teil der Zellen, die zuvor mit 30  $\mu$ M Lovastatin behandelt worden waren, erneut Medium mit 30  $\mu$ M Lovastatin, während der andere Teil der Zellen einer Kombination aus Lovastatin (30  $\mu$ M) und Mevalonat ausgesetzt wurde. 2 h später wurde durch Zugabe eines aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bestehenden Cytokin-Gemisches (CM) die iNOS-Expression induziert und nach weiteren 4,5 h die Luziferaseaktivität sowie der Proteingehalt der Zellysate bestimmt. Kontroll-Zellen (Ko) wurden 26 h mit Serum-freiem Medium inkubiert, das weder Statine noch Mevalonat oder Cytokine enthielt. Die Daten entstammen der densitometrischen Auswertung von 4 unabhängigen Gelen. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relativen iNOS-mRNA-Mengen bezogen auf den iNOS-mRNA-Gehalt in unbehandelten Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; ###,  $P < 0,001$  vs CM mit 30  $\mu$ M Lovastatin; \*,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

Meva: Mevalonat-Konzentration; Lova: Lovastatin-Konzentration

#### 4.2.4 Wirkung von FPP und GGPP auf die Statin-induzierte iNOS-Superinduktion

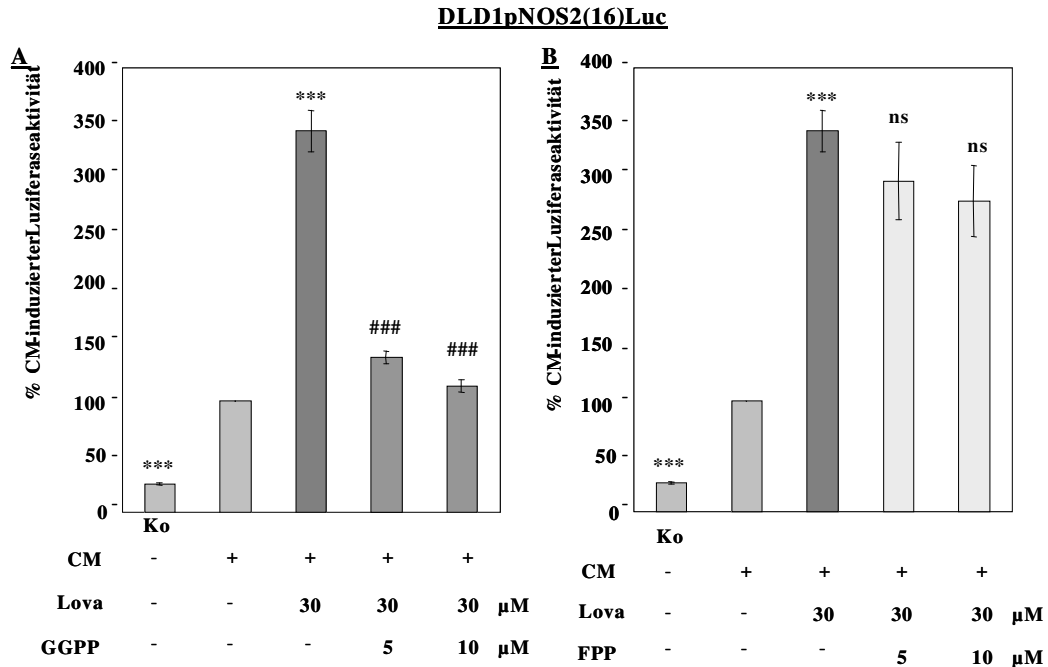
In humanen DLD1-Zellen kam es bei Lovastatin-Behandlung und parallel durchgeführter Behandlung mit GGPP kam es zu einer deutlichen Reduktion der durch Lovastatin super-induzierten iNOS-mRNA-Expression als Folge der Abhängigkeit der Rho-Aktivierung durch GGPP. Bei FPP-Behandlung kam es hingegen zu einer eher geringfügigen Hemmung der Lovastatin-superinduzierten iNOS-mRNA-Aktivität (Abb. 4-44 (B)).



**Abbildung 4-44: Wiederaufhebbarkeit der Statin-Wirkung auf die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression durch GGPP, bei nur geringer Reduktion durch FPP in DLD1-Zellen (RNase-Verdauungsschutzanalyse).** Humane DLD1-Zellen wurden 18 h mit Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von 30 μM Lovastatin vorinkubiert. Bei einem anschließenden Mediumwechsel erhielt der eine Teil der Zellen, die zuvor mit 30 μM Lovastatin behandelt worden waren, erneut Medium mit 30 μM Lovastatin, während der andere Teil der Zellen einer Kombination aus Lovastatin und GGPP bzw. FPP ausgesetzt wurde. 2 h später wurde durch Zugabe eines aus IFN-γ(100 U/ml), IL-1β (50 U/ml) und TNF-α (10 ng/ml) bestehenden Cytokin-Gemisches (CM) die iNOS-Expression induziert und nach weiteren 6 h die Gesamt-RNA isoliert. Kontrollzellen (Ko) wurden 26 h mit Serum-freiem Medium inkubiert, das weder Statine noch Pyrophosphate oder Cytokine enthält. **A:** Ergebnis einer RNase-Verdauungsschutzanalyse, bei der pro Spur 30 μg der aus den humanen DLD1-Zellen isolierten Gesamt-RNA unter Verwendung radioaktiv-markierter Antisense-RNA-Sonden gegen humane iNOS- und β-Aktin-mRNA (zur Normalisierung) untersucht wurden. Das gezeigte Gel ist repräsentativ für 3 weitere Gele mit ähnlichem Ergebnis **B:** Densitometrische Auswertungen von 4 unabhängigen Gelen mit ähnlichem Ergebnis wie unter A) gezeigt. Die Säulen (Mittelwert ± SEM) repräsentieren die relativen iNOS-mRNA-Mengen bezogen auf den iNOS-mRNA-Gehalt in unbehandelten Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; ###,  $P < 0,001$  vs CM + 30 μM Lova.

M: Molekulargewichts-Marker, ΦX174 geschnitten mit Hinf I; t: t-RNA; N: unverdaute humane iNOS-Antisense-Sonde; A: unverdaute humane β-Aktin-Antisense-Sonde.

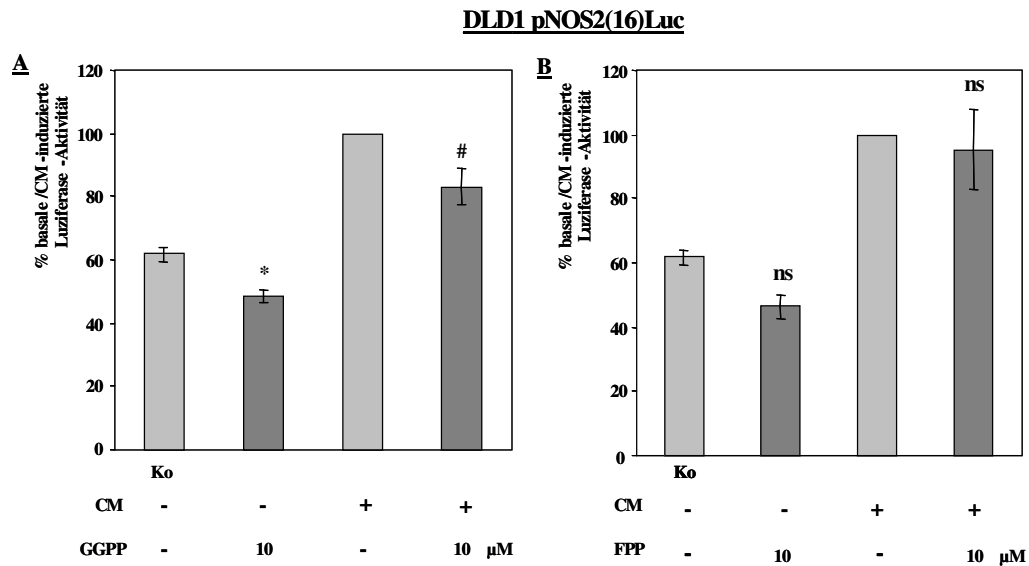
Auf Ebene des Cytokin-induzierten iNOS-Promotors kam es bei Lovastatin-superinduzierter Aktivität zu einer Aufhebung durch GGPP, jedoch nicht zur Verringerung der iNOS-Promotoraktivität durch FPP bei gleichzeitiger Lovastatin-Behandlung (Abb. 4-45 (A + B)).



**Abbildung 4-45: Aufhebende Wirkung von GGPP auf die Lovastatin-superinduzierte Aktivität des iNOS-Promotors in Cytokin-induzierten DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen (A).** Es zeigt sich jedoch kein Einfluss von FPP auf die Lovastatin-superinduzierte iNOS-Promotoraktivität (B). Stabil mit einem 16kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luziferase-Reportergen transfizierte humane DLD1-Zellen wurden 18 h mit Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von 30  $\mu$ M Lovastatin vorinkubiert. Bei einem anschließenden Mediumwechsel erhielt der eine Teil der Zellen, die zuvor mit 30  $\mu$ M Lovastatin behandelt worden waren, erneut Medium mit 30  $\mu$ M Lovastatin, während der andere Teil der Zellen einer Kombination aus Lovastatin und Mevalonat ausgesetzt wurde. 2 h später wurde durch Zugabe eines aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bestehenden Cytokin-Gemisches (CM) die iNOS-Expression induziert und nach weiteren 4,5 h die Luziferaseaktivität sowie der Proteingehalt der Zellysate bestimmt. Kontrollzellen (Ko) wurden 26 h mit Serum-freiem Medium inkubiert, das weder Statine noch Mevalonat oder Cytokine enthielt. Die Daten entstammen der densitometrischen Auswertung von 4 unabhängigen Gelen. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relative Luziferaseaktivität bezogen auf die Luziferaseaktivität in unbehandelten Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; ###,  $P < 0,001$  vs CM + 30  $\mu$ M Lova; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

M: Molekulargewichts-Marker,  $\Phi$ X174 geschnitten mit Hinf I; t: t-RNA; N: unverdaute humane iNOS-Antisense-Sonde; A: unverdaute humane  $\beta$ -Aktin-Antisense-Sonde.

Betrachtet man die basale und Cytokin-induzierte iNOS-Promotor-Aktivität so ließ sich kein Einfluss von GGPP oder FPP auf die Promotor-Aktivität in humanen DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen feststellen (Abb. 4-46 A + B).

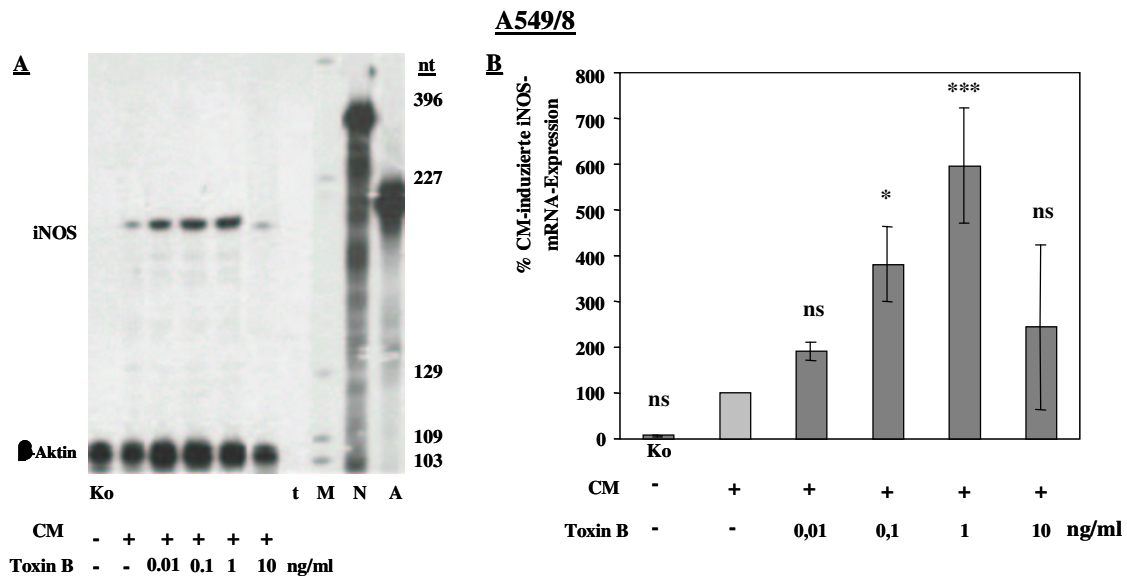


**Abbildung 4-46: Kein wesentlicher Einfluss von GGPP (A) oder FPP (B) auf die iNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen in Abwesenheit von Statinen** (Luziferase-Reportergenanalyse mittels Luziferaseaktivitätsmessung). Stabil mit einem 16kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors transfizierte DLD1-Zellen wurden 18 h mit Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von GGPP bzw. FPP präinkubiert. Anschließend wurde jeweils bei einem Teil der in Pyrophosphat-haltigem und Pyrophosphat-freiem Medium befindlichen Zellen ein aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bestehendes Cytokin-Gemisch (CM) zugesetzt und nach 4,5 h die Luziferaseaktivität sowie der Proteingehalt der Zellysate bestimmt. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) entsprechen der Auswertung von 3 unabhängigen Analysen und repräsentieren die relative Luziferaseaktivität bezogen auf die Cytokin-induzierte Luziferaseaktivität (links) bzw. die basale Luziferaseaktivität (rechts) in gänzlich unbehandelten Zellen (Ko). \*\*\*,  $P < 0,001$  vs Ko; \*,  $P < 0,05$  vs Ko; #,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

#### 4.2.5 Verstärkender Einfluss des Toxin B aus *Clostridium difficile* (TcdB) auf die iNOS-mRNA-Expression in murinen und humanen Zelllinien

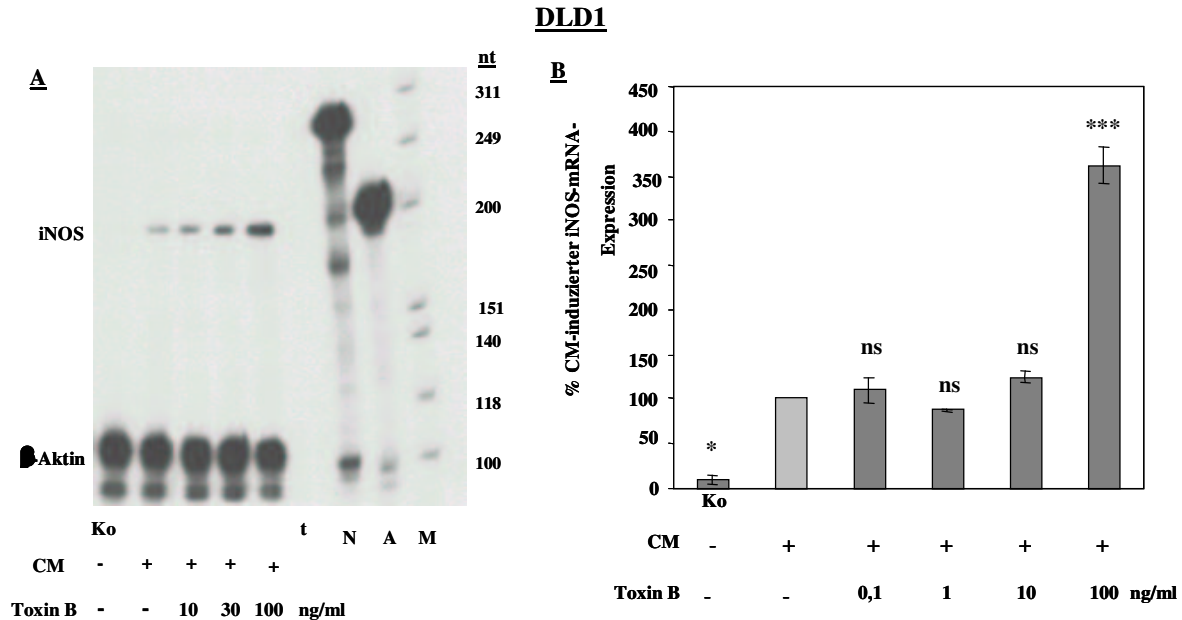
##### 4.2.5.1 TcdB superinduziert die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in humanen Zelllinien

Nach Behandlung von A549/8-Zellen mit Toxin B zeigte sich eine konzentrationsabhängige Superinduktion der iNOS-mRNA-Expression. Sie war jedoch in höheren Konzentrationen als 1 ng/ml nicht mehr steigerbar, was auf eine bei höheren Konzentrationen einsetzende Zytotoxizität des TcdB schließen lässt (Abb. 4-47 (B)).



**Abbildung 4-47: Steigerung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression nach Behandlung von A549/8-Zellen mit TcdB.** Nach 18stündiger Vorinkubation mit Serum-freiem Medium unter Anwesenheit der Toxin B-Konzentration (Toxin B) wurden humane A549/8-Zellen für weitere 8 h vor Isolation der Gesamt-RNA die iNOS-mRNA-Expression durch Zusatz eines aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bestehenden Cytokin-Gemisches (CM) unter Anwesenheit der entsprechenden Toxin B-Konzentration induziert. **A:** Repräsentatives RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gel. **B:** A549/8-Zellen nach einer Vorinkubationszeit mit Toxin B von 18 h und einer 8-stündigen Induktion mit einem Cytokin-Gemisch (CM). Densitometrische Auswertung 3er unabhängiger RNase-Verdauungsschutzanalysen mit radioaktiv-markierten Antisense-RNA-Sonden gegen humane iNOS- und  $\beta$ -Aktin-mRNA (zur Normalisierung). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relativen iNOS-mRNA-Mengen bezogen auf den iNOS-mRNA-Gehalt in unbehandelten Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM) im Vergleich zu der in komplett unbehandelten, nicht induzierten Zellen (Ko). \*,  $P < 0,05$  vs CM; \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM. t: t-RNA; N: unverdaute humane iNOS-Antisense-Sonde; L: unverdaute Luciferase-Antisense-Sonde; A: unverdaute humane  $\beta$ -Aktin-Antisense-Sonde; M: Molekulargewichts-Marker,  $\Phi$ X174 geschnitten mit *HinfI*.

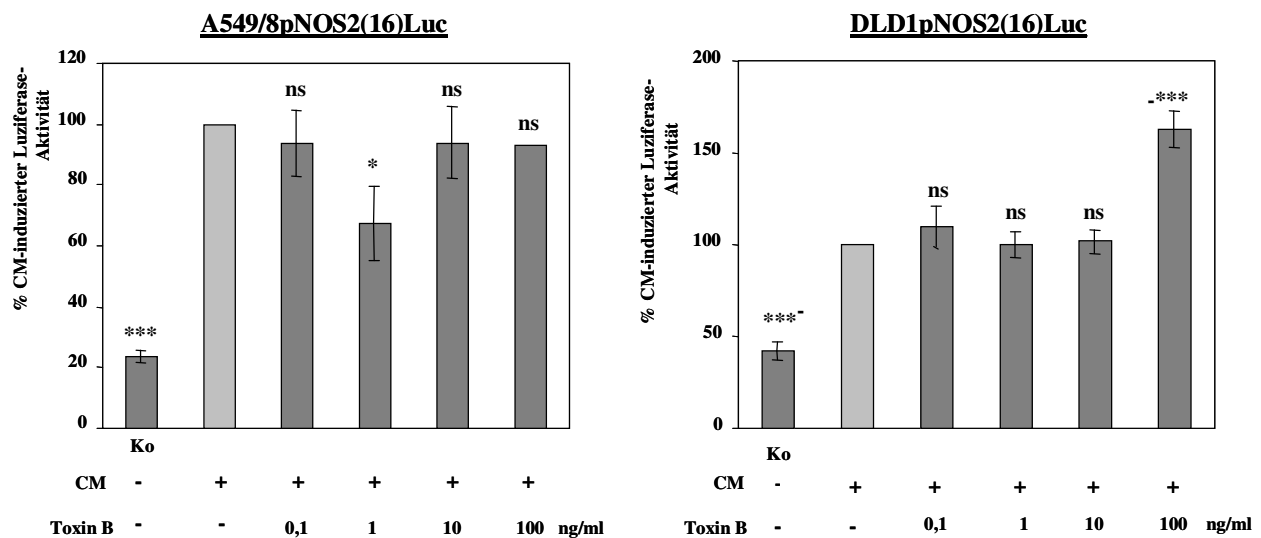
In DLD1-Zellen zeigte sich erst oberhalb einer Konzentration von 1 ng/ml eine gesteigerte iNOS-Induktion gegenüber der Cytokin-induzierten Kontrolle (Abb. 4-48 (B)).



**Abbildung 4-48: Steigerung der iNOS-mRNA-Expression nach Behandlung von DLD1-Zellen mit TcdB.** Nach 18stündiger Vorinkubation mit Serum-freiem Medium unter Anwesenheit der Toxin B-Konzentration (Toxin B) wurden humane A549/8-Zellen für weitere 6 h vor Isolation der Gesamt-RNA die iNOS-mRNA-Expression durch Zusatz eines aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bestehenden Cytokin-Gemisches (CM) unter Anwesenheit der entsprechenden Toxin B-Konzentration induziert. **A:** Repräsentatives RNase-Verdauungsschutzanalyse. **B:** Densitometrische Auswertung 3er unabhängiger RNase-Verdauungsschutzanalysen mit radioaktiv-markierten Antisense-RNA-Sonden gegen humane iNOS- und  $\beta$ -Aktin-mRNA (zur Normalisierung). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relativen iNOS-mRNA-Mengen bezogen auf den iNOS-mRNA-Gehalt in unbehandelten Zellen nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch (CM) im Vergleich zu der in komplett unbehandelten, nicht induzierten Zellen (Ko). \*,  $P < 0,05$  vs CM; \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM. t: t-RNA; N: unverdaute humane iNOS-Antisense-Sonde; L: unverdaute Luziferase-Antisense-Sonde; A: unverdaute humane  $\beta$ -Aktin-Antisense-Sonde; M: Molekulargewichts-Marker, pG1<sub>2</sub>-Basic geschnitten mit HinfI.

#### 4.2.5.2 TcdB superinduziert geringfügig die Cytokin-induzierte iNOS-Promotor-Aktivität in humanen Zelllinien

Der Cytokin-induzierte iNOS-Promotor wurde in humanen Zelllinien durch Toxin B nur sehr schwach beeinflusst. Nur bei DLD1-Zellen war eine etwa 1,5-fache Superinduktion der Cytokin-induzierten Promotoraktivität bei 100 ng/ml messbar (Abb. 4-49 (B)).

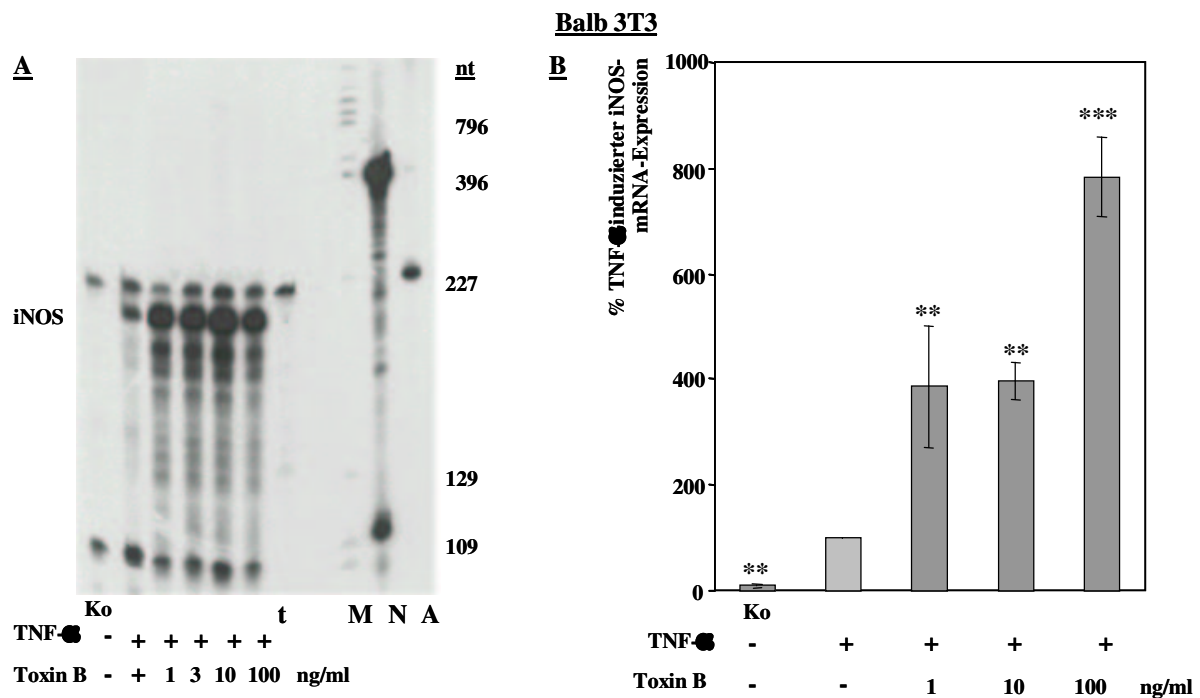


**Abbildung 4-49: Keine Induktion der iNOS-Promotor-Aktivität durch TcdB in stabil transfizierten A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen (A) und geringfügige Erhöhung der iNOS-Promotoraktivität durch das Toxin in DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen (B).** Humane A549/8- bzw. DLD1-Zellen wurden stabil mit einem 16kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luziferase-Reportergen transfiziert. Die gemessene Luziferaseaktivität normiert auf den Proteingehalt der Zellysate wurde als iNOS-Promotoraktivität angenommen. Nach 18stündiger Vorinkubation mit Serum-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von TcdB wurde dem Medium ein aus IFN- $\gamma$  (100 U/ml), IL-1 $\beta$  (50 U/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bestehendes Cytokin-Gemisch (CM) zugesetzt und nach weiteren 4,5 h die Luziferaseaktivität sowie der Proteingehalt der Zellysate bestimmt. Kontroll-Zellen (Ko) wurden 22,5 h mit Serum-freiem Medium inkubiert, das weder Statine noch Cytokine enthielt. Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) entsprechen der Auswertung von 4 unabhängigen Analysen und repräsentieren die relative Luziferaseaktivität bei den angegebenen Konzentrationen bezogen auf die Luziferaseaktivität in unbehandelten Zellen - jeweils nach Induktion mit dem Cytokin-Gemisch. \*\*\*,  $P < 0,001$  vs CM; \*,  $P < 0,05$  vs CM; ns: nicht signifikant verschieden von CM.

#### 4.2.5.3 Verstärkender Einfluss von Toxin B auf die TNF- $\alpha$ -induzierte iNOS-mRNA

##### Expression in murinen Balb3T3-Zellen

Murine Balb3T3-Fibroblasten zeigten nach Stimulierung mit TNF- $\alpha$  und Behandlung mit Toxin B eine bis zu 8fache Verstärkung der iNOS-mRNA-Expression (Abb. 4-50).



**Abbildung 4-50: Steigerung der TNF- $\alpha$ -induzierten iNOS-mRNA-Expression nach Behandlung von Balb 3T3-Zellen mit Toxin B.** Balb3T3-Zellen nach einer Vorinkubationszeit mit Toxin B von 18 h und einer 8-stündigen Induktion mit TNF- $\alpha$ . Murine Balb 3T3-Zellen wurden 18 h mit 0,5 % Serum enthaltendem Medium in An- oder Abwesenheit von Toxin B vorinkubiert. Bei einem anschließenden Mediumwechsel erhielt der Teil der Zellen außer der Kontrollzellen (Ko) TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) als Induktor der murinen iNOS-Expression und nach 8 h wurde die Gesamt-RNA isoliert. Die Menge der aufgetragenen Gesamt-RNA beträgt 20  $\mu$ g pro Spur. A: Repräsentatives RNase-Verdauungsschutzanalyse-Gel. B: Densitometrische Auswertung 3er unabhängiger RNase-Verdauungsschutzanalysen mit radioaktiv-markierten Antisense-RNA-Sonden gegen humane iNOS- und  $\beta$ -Aktin-mRNA (zur Normalisierung). Die Säulen (Mittelwert  $\pm$  SEM) repräsentieren die relativen iNOS-mRNA-Mengen bezogen auf den iNOS-mRNA-Gehalt in unbehandelten Zellen nach Induktion mit TNF- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) im Vergleich zu der in komplett unbehandelten, nicht induzierten Zellen. \*\*\*,  $P < 0,001$  vs TNF $\alpha$ ; \*\*,  $P < 0,01$  vs TNF $\alpha$ .

Toxin B: TcdB-Konzentration; N: iNOS-Sonde; A:  $\beta$ -Aktin-Sonde; M: Molekulargewichtsmarker (pG1<sub>2</sub>-Basic restringiert mit *Hinf*I); t: t-RNA.



## **5 Diskussion**

### **5.1 Suche, Auffindung und Analyse dreier die iNOS-Expression via dem JAK-STAT-Weg hemmender Wirkstoffe**

#### **5.1.1 Reporter-Analyse-Systeme und die verwendeten Vektoren für das Screening von Fermentationsprodukten mit Entzündungsrelevanz**

##### **5.1.1.1 Etablierung und Bewertung von Reporter-Screening-Analyse-Systemen zur Suche, Auffindung und Analyse spezifisch die iNOS-Expression über den JAK-STAT-Weg inhibierender Substanzen aus Pilzen**

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte zunächst ein Screening-System entwickelt und etabliert werden, das die Suche nach transkriptionellen Inhibitoren der iNOS-Synthese als entzündungsauslösendes Enzym ermöglicht. Dieses System bot die Möglichkeit hoher Probendurchsatzraten durch ein Screening im 24-Loch-Platten-Maßstab und umfassender Untersuchungen mehrerer Promotoren zur Einschätzung der Gesamteffekte auf das Entzündungsgeschehen beeinflussende Enzyme wie die iNOS und auch die COX-2.

Mittels dieses Screening-Systems wurden 60 Extrakte von Pilzen auf ihre inhibitorische Wirkung auf die Expression entzündungsrelevanter Enzyme und deren Promotoren getestet, nachdem im Primär-Screening diese Rohextrakte in Bezug auf STAT-1 $\alpha$ -abhängige Expression eines Reportergens in HeLa-S3-Zellen als positiv getestet worden waren (Durchführung *M. Saul*). Die negative Wirkung der Extrakte auf die Aktivierung der STAT-1 $\alpha$ -Signaltransduktion sollte im Idealfall nun auch von einer Hemmung des iNOS-Promotors unter dem Ausschluss zytotoxischer oder allgemeiner transkriptioneller Inhibition (Proliferations-Assay bzw. eNOS-Promotor-Analyse) begleitet werden. Im chemisch analytischen Teil dieser Arbeit wurde die Struktur der einzelnen unter Zuhilfenahme der Screening-Methoden isolierten Wirkstoffe aufgeklärt.

Ergänzend wurde auch die Hemmung des COX-2-Promotors nach Behandlung mit den aus den Aufreinigungsschritten resultierenden Reinsubstanzen untersucht.

Priorität des Selektionskriteriums	Untersuchte Zelllinie	Kriterium
1	A549/8pGASLuc	Konzentrationsabhängige Hemmung der STAT-1 $\alpha$ -abhängigen Signaltransduktion über Reporter-gen-Analysen
2	A549/8pNOS2(16)Luc	Konzentrationsabhängige Inhibition des humanen iNOS-Promotors in Reporter-gen-Analysen
3	ECVpecNOS(3.5)P1Luc	Keine oder geringfügige Hemmung des humanen ecNOS-Promotors; kein Einfluss auf die Transkriptionsmaschinerie
4	A549/8	Keine oder geringfügige Hemmung der Zellproliferation
5	A549/8	Inhibition der iNOS-mRNA-Expression
6	A549/8	NO-Produktion in Griess-Analysen als weiterer Hinweis auf die Hemmung der Aktivität des entzündungsrelevanten Enzyms iNOS
7	A549/8	Hemmung des COX-2-Promotors in Reporter-gen-Analysen als weiterer Hinweis auf die Hemmung entzündungsrelevanter Enzyme

**Tabelle 5-1: Selektionskriterien für inhibitorische, die iNOS-Synthese und den COX-2-Promotor hemmende Extrakte und Reinsubstanzen.**

Bei positiv getesteten Substanzen wurde im einzelnen die Struktur mit Hilfe von niedermolekularen Analysemethoden aufgeklärt. Die Wirkweise wurde mittels artifizieller Transkriptionsfaktor-abhängiger Promotoren (NF- $\kappa$ B, IRF-1, STAT-1 $\alpha$  oder auch NF-AT) oder durch Gelretentionsanalysen für aktivierte Transduktoren wie STAT-1 $\alpha$  zum Teil aufgeklärt.

### 5.1.1.2 Reporter-Systeme zur Analyse der Fermentationsprodukte

Durch das differentielle Screening-Verfahren mit den in Tabelle 5-1 genannten Ausschlußkriterien wurden aktive Rohextrakte, teilaufgereinigte Extrakte und aufgereinigte aktive Fermentationsprodukte gewonnen. Diese Reinsubstanzen mussten nun auch auf der Ebene der iNOS-mRNA-Transkription und der iNOS-Aktivität gemessen an der NO-Produktion ihre Wirkung bestätigen. Diese Analysen wurden mit der Zelllinie A549/8 durchgeführt, die auch als mit Cytokinen oder TPA induzierbare Modell-Zelllinie für Transfektionsanalysen mit einem COX-2-Promotor-Reporter-Konstrukt und für ebenfalls transiente Promotoranalysen zur Überprüfung des Wirkmechanismus der Substanzen (z. B. der NF- $\kappa$ B-vermittelten Signaltransduktion) eingesetzt wurde.

Screening zum Nachweis der....	Reporterzelllinie /Zelllinie	Positiv eingestufte Fermentationsprodukte zeigten...
STAT-1 $\alpha$ -abhängigen Signaltransduktion	A549/8pGASLuc	Inhibition
Spezifischen Hemmung des humanen iNOS-Promotors	A549/8pNOS2(16)Luc	Inhibition
Spezifischen Hemmung des humanen eNOS-Promotors	ECVpecNOS(3.5)P1Luc	geringe Inhibition
Hemmung der Zellproliferation	A549/8	geringe Inhibition

**Tabelle 5-2: Analysesysteme zur Bewertung aufgereinigter Fermentationsprodukte.** Zur Einschätzung der Wirksamkeit von aufgereinigten Fermentationsprodukten bei der Hemmung entzündungsrelevanter Enzyme wurden stabil und auch transient transfizierte Zelllinien verwendet. Die Festlegung unterschiedlicher Kriterien sollten die Suche nach entzündungsrelevanten Sekundärstoffe durch ihre gute Machbarkeit und ihre zeitlichen Vorteile erleichtern.

### **5.1.2 S14-95, S-Curvularin und Sporogen-A01: Verbindungen mit Wirkung auf entzündungsrelevante Enzyme**

Von den insgesamt ca. 300 getesteten Pilzextrakten (Mycel und Kulturfiltrat), zeigten im Primärscreening 60 (20%) eine inhibitorische Wirkung gegenüber der Interferon-induzierten STAT-1 $\alpha$ -abhängigen Expression des Reportergens SEAP (durchgeführt von *M. Saul* im Rahmen des Primär-Screenings). Diese Zahl wurde nach weiteren Screenings auf 6 reduziert, nachdem die Pilze im 2-l-Maßstab fermentiert und extrahiert wurden, um die Ergebnisse des Primär-Screenings zu bestätigen. Die Gründe, weshalb in diesem Fermentationsmaßstab nur noch wenige der ursprünglich als potentielle Produzenten identifizierten Pilze weiterhin Inhibitoren der STAT-1 $\alpha$ -abhängigen Signaltransduktion bildeten, sind vielfältig. Ein wichtiger Faktor dabei war das Alter der im Primär-Screening verwendeten Proben. Einerseits kommt es in den teilweise mehr als ein Jahr alten Rohextrakten durch die Lagerung der Extrakte bei – 20°C verlangsamt zu chemischen Umsetzungen oder Umlagerungen. Der Verlust der Aktivität bei einem der 6 aktiven Stämme beim Wechsel vom 2-l- zum 20-l-Maßstab bei der Fermentation ist leicht durch die unterschiedlichen Fermentationsbedingungen wie die höhere O<sub>2</sub>-Sättigung des Mediums durch die bessere Umwälzung der Kulturbrühe bedingt durch den Einsatz eines Rührers erklärbar. Die Feststellung, dass die Rohextrakte von 2 dieser 6 bearbeiteten Pilze zwar noch eine hohe Aktivität besaßen, diese aber nach der ersten chromatographischen Trennung verloren ging, hängt wahrscheinlich mit unspezifischen Effekten der komplexen Gemische zusammen. Nach Identifikation der Fermentationsprodukte, die die Expression der induzierbaren NO-Synthase über Promotorhemmung wirksam reduzierten, wurden die Daten der Promotorstudien anschließend durch RNase-Verdauungsschutzanalysen sowie Griess-Analysen für die Reinsubstanzen vervollständigt. Für zwei der Reinsubstanzen wurde eine Verringerung der iNOS-mRNA nach Behandlung mit höheren Substanzkonzentrationen festgestellt, während nur eine davon die STAT-1 $\alpha$ -Kaskade und die iNOS-Genregulation direkt beeinflusst. Allerdings konnte wiederum für alle drei Substanzen sicher nachgewiesen werden, dass sie die Nitrit-Produktion in A549/8-Zellen zu inhibieren in der Lage sind, welches auf die Hemmung der iNOS-Aktivität hinweisen könnte. Neben der Wirkung auf die iNOS haben alle Substanzen auch eine hemmende, jedoch nicht immer konzentrationsabhängige Wirkung auf den Promotor des für inflammatorische Vorgänge wichtigen Enzyms Cyclooxygenase-2.

#### **5.1.2.1 Sporogen-A01 als Hemmstoff der IFN- $\gamma$ -abhängigen Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression und Nitrit-Produktion aus *Penicillium citrinum* (48-93)**

In der humanen Zelllinie A549/8 hemmte Sporogen-A01 die durch IFN- $\gamma$  vermittelte STAT-1 $\alpha$ -abhängigen Promotoraktivität maximal bei 10  $\mu$ g/ml (40  $\mu$ M) um 90%.

Bei der zweiten humanen Zelllinie, HeLa-S3, ergab sich bereits bei 3  $\mu$ g/ml (12  $\mu$ M) eine Reduktion dieser Aktivität um 85%. Dies unterstreicht die Tatsache, dass die HeLa-S3-Zellen empfindlicher auf Sporogen-A01 reagieren, was sich auch in den durchgeführten Proliferations-Tests manifestierte. Der Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-abhängige Signaltransduktion war in HeLa-S3-Zellen geringer als der auf die STAT-1 $\alpha$ -abhängige Signaltransduktion, wobei die NF- $\kappa$ B-abhängige Promotoraktivität maximal um 60 % reduziert war. Da sich über mehrere Konzentrationsstufen von 4-120  $\mu$ M Sporogen-A01 keine Unterschiede in der Aktivität zeigten, könnte es sich evtl. um einen Effekt, der durch die erhebliche Zytotoxizität in HeLa-S3-Zellen ausgelöst wurde, handeln (SCHNEIDER, 1996). Es ist daher von einer Wirkung auf die JAK2-STAT-1 $\alpha$ -Transduktionskaskade und weniger von einer Beeinflussung des NF- $\kappa$ B durch die Verbindung auszugehen.

Sporogen-A01 wurde bereits als Inhibitor der Zellproliferation und mikrobiellen Wachstums erkannt, wie Daten aus der Dissertation von G. Schneider (1996) und andere Befunde (TANAKA *et al.*, 1984) belegen. In humanen Zellen wie HeLa-S3 und HL-60, eine humane myelotische Zelllinie, wurde für Sporogen-A01 sowie für die racemisierten Formen ein IC<sub>50</sub> von 5  $\mu$ g/ml (20  $\mu$ M) bzw. 1  $\mu$ g/ml (4  $\mu$ M) ermittelt, welcher deutlich unter dem für die wesentlich unempfindlicheren A549/8-Zellen (50  $\mu$ g/ml; 200  $\mu$ M) liegt. Erstmals wurde Sporogen-A01 1982 im Rahmen eines Screenings als für den Welkvorgang beschleunigendes Toxin (BOTTALICO *et al.*, 1982) in *Phoma destructiva* gefunden. Das Sesquiterpen wurde ferner aus Pilzen wie *Aspergillus oryzae* und *Hansfordia pulvinata* isoliert und als phytotoxisch, antifungisch und sporogen charakterisiert (TIRILLY *et al.*, 1983; MORI & TAMURA, 1988; TANAKA *et al.*, 1984). Die Synthese der Verbindung ausgehend von Cyclo-Buta-1,3-dien-1-al-4-anhydrid ist bekannt und führt neben der Bildung von Sporogen-A01 auch zur Bildung von Phomenon im Verhältnis 88:12 (KITAHARA *et al.*, 1991). Die Biosynthese der Verbindung im Zusammenhang mit dessen Verwendung als sporogene Substanz zur Aufrechterhaltung der Fermentation von *Aspergillus oryzae*, der einer der wichtigsten Produzenten japanischer Nahrungsmittelenzyme und Geschmacksverstärker ist,

wird ausgehend von einem Eremophilan-Grundgerüst bis hin zum Sesquiterpen beschrieben (TANAKA *et al.*, 1984).

Zuerst wurde die Substanz von SCHNEIDER (Dissertation, 1996) biologisch näher charakterisiert. Die Charakteristika wie Phytotoxizität und antifungische Eigenschaften konnten von SCHNEIDER (1996) bestätigt werden. In eigenen Versuchsreihen wirkte Sporogen-A01 auch antifungisch und in HeLa-S3-Zellen proliferationshemmend. Außerdem wurde durch die Verbindung die Aggregation von Thrombozyten gehemmt (SCHNEIDER, *Original-Dissertation*, 1996). Vermutlich liegt die biologische Aktivität in der  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Ketogruppe, der Methylen- oder der Epoxidgruppe innerhalb des Moleküls begründet. Derivatisierungen ergaben eine erheblich geringere Wirksamkeit der Substanz (SCHNEIDER, *Original-Dissertation*, 1996). Nach der Umwandlung der Keto- in eine Epoxidgruppe durch Methylierung folgte eine geringere antifungische Aktivität, während bei Acetylierung die Ketogruppe erhalten blieb und die Aktivität verloren ging. In Tests zur Überprüfung einer möglichen Hemmung der Makromolekülsynthesen fand sich in A549/8-Zellen eine Hemmung der Makromolekülelongation für DNA, Protein und besonders für die RNA nach Sporogen-A01-Behandlung. Dies steht nur scheinbar im Widerspruch zur kaum verminderten Aktivität des eNOS-Promotors in diesen Zellen, da Sporogen-A01 wahrscheinlich auch direkt auf die Elongation der Makromoleküle wirkt, ohne die Transkription über transaktivierende Faktoren wesentlich zu beeinflussen (Abbildungen 4-23 bzw. 4-21). Es könnte hier eine Drosselung der Ribonukleotidpolymerasen- und der ribosomalen Aktivität durch die Substanz vorliegen, die jedoch nicht die Wirkung der Substanz auf den Transkriptionsfaktor STAT-1 $\alpha$  überlagert.

Die Produktion von Sporogen-A01 durch *Penicillium* 48-93 war nicht konstitutiv, sondern stark von den Milieubedingungen und weniger von der Wachstumsphase abhängig. Unter Verwendung von Medien, die mehr Maltose als Glucose enthielten (Medium M3), ließ sich die produzierte Menge an Sporogen-A01 um ein Vielfaches gegenüber der Fermentation mit Glucose-reichen Medien (Medium M1) steigern (Abbildung 4-1). Ergebnisse von Schneider (1996) belegten bei einem anderen Sporogen-A01 produzierenden Stamm, I85-94, auch in Maltose-ärmerem HA-Medium erhöhte Sporogen-A01-Produktion. Der Stamm I85-94 scheint Sporogen-A01 weniger effektiv als 48-93 aus Maltose bilden zu können. Die Aufklärung der Struktur von Sporogen-A01 gelang mit Standardmethoden (SORRELL, 1988; CREWS *et al.*, 1998).

#### **5.1.2.1.1 Sporogen-A01 hemmt die Aktivität des Cytokin-induzierten humanen iNOS Promotors in A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen und die Cytokin-induzierte iNOS mRNA-Expression in A549/8-Zellen**

In humanen Zelllinien wie der A549/8-Zelllinie hemmte Sporogen-A01 die Cytokin-induzierte iNOS-Promotoraktivität mit einem IC<sub>50</sub> von 2,3 µg/ml (9,2 µM), wobei die maximale Cytokin-Induktion ohne Sporogen-A01-Behandlung einem Wert von 100 % entspricht (Abbildung 4-22). Die ebenfalls festgestellte Wirkung der Substanz auf die eNOS-Promotoraktivität war im Vergleich zum iNOS-Promotor sehr gering - es ergab sich lediglich eine Verringerung der Promotoraktivität um 20 % (Abbildung 4-23). Sporogen-A01 hatte jedoch einen deutlichen inhibitorischen Einfluss auf die COX-2-Promotoraktivität - mit einem IC<sub>50</sub> von 10 µg/ml (40 µM) (Abbildung 4-15). Diese Wirkungen sind nicht auf unspezifische Toxizität der Substanz zurückzuführen, da die Proliferation von A549/8-Zellen kaum von der Substanz beeinflusst wurde (Abb. 4-9).

Die Expression der iNOS auf der Ebene der mRNA-Synthese wurde von Sporogen-A01 mit einem IC<sub>50</sub> von 5,1 µg/ml (20 µM) inhibiert (Abbildung 4-28), was mit der Hemmung des iNOS-Promotors durch die Substanz in A549/8-Zellen in etwa vergleichbar ist.

#### **5.1.2.1.2 Sporogen-A01 hemmt die Cytokin-induzierte Nitrit-Produktion in humanen A549/8-Zellen über die Hemmung IFN- $\gamma$ -abhängiger Signaltransduktionswege**

Bei einer Sporogen-A01-Konzentration von 0,6 µg/ml (2,4 µM) liegt die Inhibition der NO-Produktion Cytokin-induzierter A549/8-Zellen bei 30 %. Die gegenüber der iNOS-mRNA-Expression noch gesteigerte Reduktion der iNOS-Aktivität lässt sich durch die Akkumulation der über einen längeren Zeitraum bestehenden Substanz-Wirkung erklären.

Um die Wirkung der Verbindung mechanistisch aufzuklären, erfolgte eine Kurzzeit-Vorbehandlung der A549/8-Zellen mit der Substanz gefolgt von einer nur 30-minütigen Cytokin-Induktion, um anschließend die Beeinflussung der Hemmung der STAT-1 $\alpha$ -abhängigen Signaltransduktion durch Sporogen-A01 direkt nachzuweisen. Es konnte nach der Behandlung Cytokin-induzierter Zellen mit Sporogen-A01 in einer Konzentration von 10 µg/ml (40 µM) eine Verringerung der STAT-1 $\alpha$ -Bindung an die GAS-Konsensussequenz in der Gelretentionsanalyse nachgewiesen werden (Abbildung 4-34).

Allerdings sind diese Vermutungen noch durch Western Blot-Analysen mit dem Nachweis der phosphorylierten aktiven Form des STAT-1 $\alpha$ -Faktors im Kern und somit die Hemmung der Translokation des Transkriptionsfaktors in den Kern zu bestätigen. Die Hemmung der iNOS-Expression durch Sporogen-A01 wäre dann über diesen Mechanismus zu erklären. Eine weitere Möglichkeit wäre der Angriff der Substanz über eine direkt gehemmte Tyrosinkinase-JAK2-Aktivität.

#### **5.1.2.2 S-Curvularin als Inhibitor der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression und Nitrit-Produktion**

S-Curvularin wurde erstmals aus *Penicillium baradicum* *Baghdadi* NRRL 3754 als Sekundärmetabolit gewonnen (VESONDER *et al.*, 1976). S-Curvularin (2H-3-Benzoxacyclododecin-2,10(1H)-dion, 4,5,6,7,8,9-hexahydro-11,13-dihydroxy-4-methyl-, (S)-(9CI)) wurde bereits 1974 beschrieben, jedoch wurde die Charakterisierung nur unvollständig durchgeführt, so dass später mit der Substanz arbeitende Forscher wie *Vesonder et al.* 1976 dies vertieften und S-Curvularin als für HeLa-S3-Zellen zytotoxische, dem Östrogen Zearalanon strukturell ähnliche Substanz beschrieben. Die enantiodivergente Synthese der Enantiomere des makrozyklischen Laktons Curvularin ist bekannt (BRACHER & SCHULTE, 1995). Die biologisch aktive Form ist die  $\alpha$ -Form (S-Curvularin), während die  $\beta$ -Dehydro-Form des Curvularin im Zusammenhang mit entzündungsrelevanten Enzymen oder Faktoren eine biologisch inaktive Form zu sein scheint. Die S-Curvularin-Bildung durch *Penicillium spec* (Stamm 9-93) war nicht konstitutiv, sondern stark von den Milieubedingungen und weniger von der Wachstumsphase abhängig. So konnte durch Erhöhung des Maltoseanteils zu ungunsten des Glucoseanteils bei der Fermentation die unter Standardbedingungen produzierte Menge an S-Curvularin stetig erhöht werden. Die Aufklärung der Struktur von S-Curvularin gelang mit Standardmethoden (SORRELL, 1988; CREWS *et al.*, 1998) und wurde durch *M. Saul* und *Prof. O. Sterner* realisiert.



#### **5.1.2.2.1 S-Curvularin hemmt die Aktivität des Cytokin-induzierten humanen iNOS-Promotors in A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen und die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen**

In der stabil mit pNOS2(16)Luc transfizierten humanen Zelllinie A549/8 konnte S-Curvularin die iNOS-Promotoraktivität mit einem  $IC_{50}$  von 2,5  $\mu\text{g/ml}$  (8,5  $\mu\text{M}$ ) erniedrigen. Die maximale Hemmung der Promotoraktivität erreichte 65 % der Promotoraktivität der lediglich mit Cytokinen behandelten Zellen (Abbildung 4-26). Die iNOS-Promotoraktivität der mit einer Sporogen-A01-Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  behandelten Zellen lag auf dem gleichen Niveau wie die der Kontrollzellen ohne Induktion. Während die eNOS-Promotoraktivität nach S-Curvularin-Behandlung unverändert blieb (Abbildung 4-27), wurde die COX-2-Promotoraktivität in transient transfizierten A549/8-Zellen durch S-Curvularin mit einem  $IC_{50}$  von 15  $\mu\text{g/ml}$  (62  $\mu\text{M}$ ) bis zu 80 % inhibiert (Abbildung 4-17). Ergänzend zu den Daten aus der Analyse der S-Curvularin-Wirkung auf den nicht induzierbaren eNOS-Promotor ist die geringe Zytotoxizität der Substanz gemessen mittels der Proliferation von A549/8-Zellen (Abbildung 4-10) sowie von HeLa-S3-Zellen zu erwähnen. Dies spricht für eine spezifische Substanzwirkung auf die iNOS-Promotoraktivität sowie auf die mRNA-Synthese vermittelt durch STAT-1 $\alpha$ .

Auf der mRNA-Ebene wurde die iNOS von S-Curvularin mit einem  $IC_{50}$  von 25,7  $\mu\text{g/ml}$  (88  $\mu\text{M}$ ) inhibiert (Abbildung 4-29). Dabei wurde eine maximal 85%ige Hemmung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression erreicht.

#### **5.2.2.2.2 S-Curvularin hemmt die Cytokin-induzierte Nitrit-Produktion von humanen A549/8-Zellen konzentrationsabhängig und beeinflusst divergierende Wege zur Aktivierung der iNOS**

Die Cytokin-induzierte Aktivität der iNOS gemessen am Nitritgehalt des Überstandes S-Curvularin-behandelter A549/8-Zellen zeigte eine etwas stärker ausgeprägten Reduktion im Vergleich mit der iNOS-mRNA-Expression bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{g/ml}$  (120  $\mu\text{M}$ ) lag die Inhibition bei 40 % der NO-Produktion der lediglich Cytokin-induzierten Zellen (Abbildung 4-32).

In der A549/8pGAS-Luc-Zellen hemmte S-Curvularin die durch STAT-1 $\alpha$  beeinflusste GAS-Promotoraktivität maximal bei 100  $\mu\text{g/ml}$  (0,35 mM) um 75 % (Abbildung 4-16).

Bei der zweiten humanen Zelllinie, HeLa-S3, ergab sich bereits bei 30 µg/ml (0,1 mM) eine Reduktion dieser Aktivität um 80 %. Dies unterstreicht die Tatsache, dass die HeLa-S3-Zellen empfindlicher auf S-Curvularin reagieren, was sich in den durchgeführten Proliferation-Tests manifestierte (siehe Kap. 4.1.4.1.2). Der Einfluss auf die NF-κB-vermittelte Signaltransduktion war in HeLa-S3-Zellen geringer als der auf die STAT-1α-beeinflußte Aktivierung (Kap. 4.1.4.2.2.1 und 4.1.4.2.2.2.), wobei die NF-κB-abhängige Promotoraktivität maximal um 50 % reduziert war. In HeLa-S3-Zellen hemmte S-Curvularin die durch NF-κB-Konsensus-Konkatemere beeinflusste Minimalpromotoraktivität mit einem IC<sub>50</sub> bei 11 µg/ml (44 µM). S-Curvularin scheint also auch auf die NF-κB-vermittelte Expression eine Wirkung zu haben (max. 50 % der Cytokin-induzierten Kontrolle), die in der Potenz ähnlich der Inhibition via JAK2-STAT-1α-Weg zu sein scheint (auch max. 50 % der Cytokin-induzierten Kontrolle). In Tests zur Überprüfung einer eventuellen Hemmung der Makromolekülsynthesen fand die Arbeitsgruppe um PD Dr. G. Erkel in Jurkat-Zellen keine Hemmung der Makromolekülelongation für DNA, RNA und Protein nach S-Curvularin-Behandlung. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der kaum verminderten Aktivität des eNOS-Promotors in diesen Zellen. Dies spricht nicht dafür, dass die Verbindung die STAT-1α-abhängigen Transkription direkt hemmt und so ein generalisierter Effekt z. B. mit Wirkung auf den Zellzyklus ausgeschlossen werden kann.

Auf Proteinebene ließ sich dieses Ergebnis mittels STAT-1α-Western Blots nicht nachweisen, da sich widersprechende Resultate für die gehemmte STAT-1α-Translokation in den Kern einstellten (nicht dargestellt). In Jurkat-Zellen war S-Curvularin in der Lage, die Aktivität des TNF-α-Promotors mit einem IC<sub>50</sub> bei 13 µg/ml (50 µM) zu reduzieren (Kap. 4.1.4.2.2.4).

### **5.1.2.3 S14-95 als Inhibitor der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression und Nitrit-Produktion**

Die Verbindung S14-95 wurde von der Arbeitsgruppe um PD Dr. G. Erkel aus einem Fungus imperfectus der Gattung *Penicillium* isoliert.

Die Aufklärung der Struktur von S14-95 gelang mit Standardmethoden (SORRELL, 1988; CREWS *et al.*, 1998) realisiert durch M. Saul und Prof O. Sterner.

#### **5.1.2.3.1 S14-95 hemmt die Aktivität des Cytokin-induzierten humanen iNOS-Promotors in A549/8pNOS2(16)Luc-Zellen und die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in A549/8-Zellen**

In der Zelllinie A549/8pGASLuc hemmte S14-95 die STAT-1 $\alpha$ -abhängige Promotoraktivität mit einem IC<sub>50</sub> von 8,1  $\mu$ g/ml (18,6  $\mu$ M). Dabei wurde eine fast vollständige Hemmung der STAT-1 $\alpha$ -abhängigen Promotoraktivität erreicht (Abbildung 4-18). In HeLa-S3-Zellen lag der IC<sub>50</sub> bei 4  $\mu$ g/ml (10  $\mu$ M), da diese Zelllinie offensichtlich deutlicher als die Alveolar-Karzinomzellen auf S14-95 reagierten (siehe Kap. 4.1.4.2.3.1). Die Wirkung auf die NF- $\kappa$ B-vermittelte Signaltransduktion war in HeLa-S3-Zellen nicht erkennbar (Abb. 4-19). Die fehlende NF- $\kappa$ B-Hemmung und die deutliche Hemmung der GAS/ISRE-Konstrukte durch S14-95 in HeLa-S3-Zellen spricht für eine spezifische Hemmung der STAT-1 $\alpha$ -Proteine. Die Verbindung hemmte die Proliferation von A549/8-Zellen weniger und von HeLa-S3-Zellen deutlich (Kap. 4.1.4.1.3), übte also eine ähnlich dem Sporogen-A01 unterschiedliche Wirkung auf das Wachstum unterschiedlicher humaner Zelllinien aus. Die Makromolekülsynthesen wurden in Jurkat-Zellen von S14-95 jedoch nicht beeinflusst (Daten erhoben von der Arbeitsgruppe um PD Dr. G. Erkel).

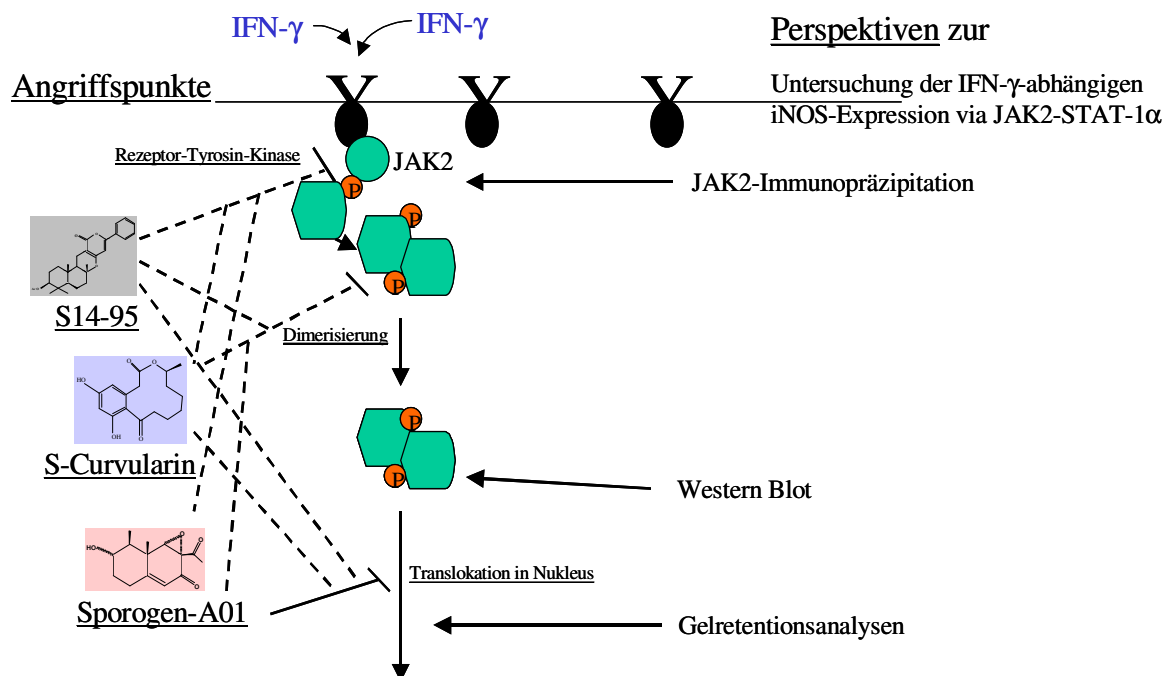
#### **5.1.2.3.2 S14-95 hemmt die Cytokin-induzierte Nitrit-Produktion in humanen A549/8-Zellen konzentrationsabhängig und beeinflusst STAT-1 $\alpha$ , nicht aber NF- $\kappa$ B-abhängige Wege zur Aktivierung der iNOS**

In A549/8-Zellen konnte S14-95 die iNOS-Promotoraktivität mit einem IC<sub>50</sub> von 3  $\mu$ g/ml (6,9  $\mu$ M) erniedrigen, während die eNOS-Promotoraktivität nach Behandlung mit S14-95 unverändert blieb. S14-95 hatte auf die TPA-induzierte COX-2-Promotoraktivität keinen Einfluss. Die iNOS-Expression auf der Ebene der mRNA wurde von S14-95 mit einem IC<sub>50</sub> von 50  $\mu$ g/ml (110  $\mu$ M) gehemmt (Abbildung 4-30). Dieser Wert, der die Regulation über den iNOS-Promotor nur sehr begrenzt bestätigt, könnte auf einen spezifischen Einfluss der Verbindung auf den Promotor oder auf eine Toxizität in A549/8-Zellen hindeuten. Die Inhibition der Nitritproduktion nach S14-95-Behandlung war mit einem die iNOS-Aktivität betreffenden IC<sub>50</sub> mit 24,5  $\mu$ g/ml (56  $\mu$ M) als Summe der Wirkung auf iNOS-mRNA-Expression, iNOS-Promotoraktivität oder iNOS-mRNA-Stabilität relativ deutlich. Die Wirkung des S14-95 auf die STAT-1 $\alpha$ -Signalprotein-vermittelte Signaltransduktion des hu-

manen iNOS-Gens wird hier nur bezüglich der Promotoraktivierung in humanen A549/8pGAS-Luc-Zellen als hemmend nachgewiesen (Abbildung 4-18). In Jurkat-Zellen hemmte S14-95 die Aktivität des TNF- $\alpha$ -Promotors mit einem IC<sub>50</sub> bei 6  $\mu\text{g/ml}$  (14  $\mu\text{M}$ ). Auch der humane NFAT-abhängige Promotor in Jurkat-Zellen wurde durch S14-95-Behandlung mit einem IC<sub>50</sub> von 9  $\mu\text{g/ml}$  (20  $\mu\text{M}$ ) deutlich inhibiert (Kap. 4.1.4.2.3.4 und 4.1.4.2.3.5).

#### 5.1.2.4 Wirkungen der isolierten Verbindungen auf die (transkriptionelle) Regulation der humanen iNOS

In Abb. 5-1 sind die Angriffspunkte und die bereits nachgewiesenen Wirkungen der drei isolierten Verbindungen auf Komponenten des JAK-STAT-Weges dargestellt. Da bisher nur für die Substanz Sporogen-A01 eine direkte Wirkung auf die Bindung von STAT-1 $\alpha$  nachgewiesen wurde (Kap. 4.1.3.7) sind noch weitere Analysen wie Western Blots zum Nachweis der STAT-1 $\alpha$ -Translokation in den Kern (Aktivierung) oder auch Immunopräzipitationen von JAK2 zum Nachweis der direkten Tyrosylkinase-Hemmung durch eine Verbindung notwendig.



**Abbildung 5-1: Vermutliche Wirkweise der aus Pilzen isolierten Substanzen S14-95, Sporogen-A01 und S-Curvularin.** Betrachtet wurde nur die Hemmung der JAK2-STAT-1 $\alpha$ -Signaltransduktion, die zur negativen Modulation der iNOS-mRNA-Expression führte. Als mögliche Ansatzpunkte für eine Modulation der iNOS-Expression kommen unterschiedliche Komponenten des Signalwegs in Frage. Für Sporogen-A01 ist bereits über Gelretentionsanalysen eine direkte Hemmung der STAT-1 $\alpha$ -Bindung nachgewiesen worden.

## **5.2 Regulation der iNOS-Expression über kleine G-Proteine der Rho-Familie**

### **5.2.1 Verstärkung der Cytokin-induzierten iNOS-Expression durch Statine**

Die Lipidsenker der Gruppe der Statine wurden in umfassenden klinischen Studien auch im Hinblick auf deren vermutete Wirkung auf artherosklerotische Folgeerkrankungen untersucht. In Studien wie der 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study) (Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) Group, 1994), CARE (Cholesterol and Recurrent Events) (SACKS *et al.*, 1996), LIPID (Long-term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease) (Long-term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group, 1998) oder WOSCOPS (West Of Scotland Coronary Prevention Study) (MAHER *et al.*, 1997), wurde gezeigt, dass Cholesterinsynthese-Hemmer das Risiko, an einem Herzinfarkt oder einem Schlaganfall zu erkranken, deutlich reduzieren. Neben der anti-atherosklerotischen Wirkung musste aufgrund der Verbesserung des Gesundheitszustandes auch der Patienten mit normalem Cholesterinspiegel ein anderer physiologischer Prozess wie die durch die Hemmung der Isoprenoidsynthese verhinderte Farnesyl- bzw. Geranylgeranylierung der von Signalproteinen eine positive Wirkung haben. Es wurde nachgewiesen, dass die Membranverankerung der G-Proteine durch diese Isoprenoideinheiten stabilisiert wird, wobei die Ras-Proteine vor allem farnesyliert und die Rho-Proteine geranylgeranyliert werden (GIBBS & OLIFF, 1997).

Kleine G-Proteine als Bindeglieder zwischen den Cytokinrezeptoren und den Stimulus-abhängigen Signaltransduktionswegen (DENHARDT, 1996; LIM *et al.*, 1996) könnten die Induktion der iNOS durch Cytokine gewährleisten und somit stellen die Statine, wirkend über die Hemmung der Isoprenoidsynthese, wichtige Regulatormoleküle dar.

In der allgemeinen physiologischen Betrachtung der Statine haben diese als lipophile Verbindungen gute resorptive Eigenschaften. Sie werden jedoch zum Großteil hepatisch eliminiert, das zu einem Verlust von 95 % der Substanzen vor deren Eintritt in die Blutbahn führt. Die Statine werden in der Leber als Cholesterin-bildendes Organ akkumuliert, haben aber abgesehen von nicht auf einen Krankheitszustand einzuordnenden Anstieg der Transaminaseaktivität keinen Einfluss auf den Zustand der Leber. Allerdings erwies sich der CK(Creatin-Kinase)-Anstieg als Ausdruck einer starken Myopathie als begrenzender Faktor für die Verabreichung der Statine. Der iNOS zugesprochene hepatoprotektive Einfluss könnte

darauf hindeuten, dass die kaum vorhandenen Nebenwirkungen der Statine teilweise einer Induktion der iNOS zu verdanken sind. Die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Analysen konnte nicht nur für die Zelllinien DLD1 (humane Kolon-Adenokarzinom-Zellen) und A549/8 (humane Alveolarepithel-Karzinom-Zellen), sondern auch für murine Balb3T3-Zellen (Fibroblasten) ein verstärkender Effekt auf die iNOS-Expression gezeigt werden (Abbildungen 4-37 (A + B)). Die iNOS-mRNA-Expression konnte sowohl mit Atorvastatin als auch mit Lovastatin relativ einheitlich bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M 1,5- bis 2-fache und bei 30  $\mu$ M 2,5- bis 4-fache der iNOS-mRNA-Expression der Cytokin-induzierten Kontrolle (RNase-Verdauungsschutzanalyse) nach den in Tab. 3-3 angegebenen Induktionszeiten superinduziert werden. In den murinen Fibroblasten ergab sich bei gleichen Induktionsbedingungen eine Steigerung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression von ca. 5-fach bei Atorvastatin und bis zu 8-fach bei Lovastatin (Abbildungen 4-37 (A + B)). Die NO-Produktion der humanen Zellen ermittelt über die Griess-Analyse der Zellüberstände nach 36stündiger Cytokin-Induktion vervierfachte sich im Vergleich zu nicht induzierten Zellen (Abbildung 4-38). Die iNOS-mRNA-Expression und die NO-Produktion nicht-induzierter Zellen wurden nur unwesentlich durch die Statine beeinflusst. Bereits 1997 hatten *Finder et al.* in Ratten-Hepatozyten und in VSMC-Zellen (Vascular Smooth Muscle Cells) der Ratte in Gegenwart von Lovastatin eine Superinduktion der IL-1 $\beta$ -induzierten iNOS-Expression beobachtet (FINDER *et al.*, 1997). In einer im Jahr 2000 veröffentlichten Arbeit kamen *Muniyappa et al.* mit Mevastatin, einem nahen Verwandten von Lovastatin, in VSMC-Zellen der Ratte zum gleichen Ergebnis (MUNIYAPPA *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu beschrieben *Pahan et al.* für Lovastatin einen inhibitorischen Effekt auf die LPS-induzierte iNOS-Expression in primären Ratten-Astrozyten (PAHAN *et al.*, 1997).

#### **5.2.1.1 Molekulare Mechanismen zur Beeinflussung der iNOS-Expression durch Statine über die Transkriptionsrate durch Statine in humanen und murinen Zelllinien**

Zum einen wird die iNOS-mRNA-Menge von der RNA-Synthese-Rate und somit von der iNOS-Promotor-Aktivität reguliert, zum anderen bestimmt der Abbau der iNOS-mRNA über die Zeit als bestimmender Faktor die Stabilität des bereits synthetisierten spezifischen Transkripts. Die durch Atorvastatin bzw. Lovastatin hervorgerufene Erhöhung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Menge kann deshalb entweder aus einer gesteigerten iNOS-

Promotoraktivität oder einer erhöhten iNOS-mRNA-Stabilität, oder aber auch aus einer Kombination aus beiden resultieren. Da anzunehmen ist, dass es bei der Aktivierung des iNOS-Promotors bzw. des iNOS-mRNA-Abbaus zellspezifische Unterschiede geben könnte, wurden für die Analyse der Statin-Wirkung DLD1- und A549/8-Zellen, die stabil mit einem 16kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor Luziferase transfiziert worden waren, verwendet. Außerdem wurden zum Vergleich der Wirkung der Statine auf die iNOS-mRNA anderer Spezies murine Balb 3T3-Zellen untersucht. In stabil mit dem Promotorelement transfizierten DLD-1-Zellen waren Atorvastatin und Lovastatin beide in der Lage, die durch Cytokine induzierte Promotoraktivität in Abhängigkeit von der Statinkonzentration auf mehr als das 2,5-fache zu steigern (Abbildung 4-40 (A+B)). Dies gleicht in etwa der auf der mRNA-Ebene in RNase-Verdauungsschutz-Analysen erzielten Superinduktion der iNOS-Expression.

In stabil transfizierten DLD1-Zellen wurde zusätzlich die Luziferase-Reportergen-Expression auf mRNA-Ebene mittels RNase-Verdauungsschutzanalyse untersucht (Abbildung 4-41). Auch dieser methodische Ansatz bestätigte die Statin-vermittelte Erhöhung der Cytokin-induzierten iNOS-Promotoraktivität, die auf der Ebene der Luziferaseaktivität gefunden worden war. Demgegenüber konnten die beiden Statine die Cytokin-induzierte iNOS-Promotoraktivität in stabil transfizierten A549/8-Zellen nur geringfügig um einen Faktor kleiner als 1,5 steigern (Abbildung 4-39). Da jedoch auch in dieser Zelllinie die Cytokin-induzierte iNOS-Expression auf mRNA-Ebene durch 30  $\mu$ M Statin etwa um den Faktor 3 gesteigert worden war (Abbildung 4-35; Abbildung 4-36), muss die Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen - im Sinne einer gesteigerten mRNA-Stabilität - angenommen werden. Die in murinen Zellen ebenfalls untersuchte iNOS-Expression war durch die Statine sogar mit einer 8-fachen Superinduktion steigerbar, das den Spezies-übergreifenden Einfluss der Statine unterstreicht (Abbildung 4-37). *Laufs und Liao*, die den Einfluss von Mevastatin auf die Expression der konstitutiv exprimierten eNOS untersucht hatten, führten die beobachtete Erhöhung der eNOS-mRNA-Expression in Gegenwart des Statins auf eine mRNA-Stabilisierung zurück (LAUFS & LIAO, 1998). Keine der drei oben erwähnten Arbeitsgruppen, die den Einfluss von Statinen auf die iNOS-Expression in Ratten-Zellen erforscht haben (FINDER *et al.*, 1997; MUNIYAPPA *et al.*, 2000; PAHAN *et al.*, 1997), hat die Wirkung von Statinen auf die iNOS-Promotoraktivität getestet oder gar deren Einfluss auf die iNOS-mRNA-Stabilität analysiert.

Das Dogma einer ausschließlich auf transkriptioneller Ebene regulierten iNOS-Expression hat jedoch keinen Bestand mehr. So fand man bei Sequenzanalysen der 3'-untranslatierten Region der humanen iNOS-mRNA (GELLER *et al.*, 1993) viermal das Sequenzmotiv (AUUUA), von dem man weiß, dass es die mRNA's von Protoonkogenen und Cytokinen destabilisiert (CAPUT *et al.*, 1986). In Transfektionsexperimenten mit humanen A549/8- und DLD1-Zellen führte die 3'-untranslatierte Region der humanen iNOS-RNA in der Tat zu einer Destabilisierung der mRNA des Luziferase-Reportergens. Die ARE-Sequenzen interagieren mit verschiedenen Bindeproteinen. Ein Beispiel für ein solches Protein ist HuR, von dem Rodriguez-Pascual *et al.* zeigen konnten, dass es mit hoher Affinität an die AUUUA-Motive in der 3'-untranslatierten Region der humanen iNOS-mRNA bindet und darüber zu einer Stabilisierung der iNOS-mRNA führt (RODRIGUEZ-PASQUAL *et al.*, 2000). Die humanen Zelllinien DLD1 und A549/8, die mit dem 16kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luziferase-Reportergen (pXP<sub>2</sub>iNOS(16)Luc) transfiziert worden waren, wiesen beide unter basalen Bedingungen ohne Cytokine Luziferaseaktivität auf, was als Hinweis auf eine basale iNOS-Promotoraktivität gewertet werden kann. Bestätigt wurden diese Ergebnisse mit 'Nuclear-Run-On'-Analysen zur *in vitro*-Transkription mit isolierten Zellkernen, die eine basale Aktivität des endogenen iNOS-Promotors zeigten (DE VERA *et al.*, 1996; LINN *et al.*, 1997). Während die basale Aktivität des stabil in DLD1-Zellen transfizierten 16kb-Fragments des humanen iNOS-Promotors ausreichte, um eine mit der RNase-Verdauungsschutzanalyse detektierbare Menge an Luziferase-Reporter-mRNA hervorzubringen, resultierten aus der endogenen iNOS-Promotoraktivität keine nachweisbaren iNOS-mRNA-Mengen (Abbildung 4-41). In stabil transfizierten DLD1- und A549/8-Zellen hatten beide Statine keinen erheblichen Einfluss auf die basale Luziferaseaktivität. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Statine die iNOS ohne Cytokin-Gabe nicht zu induzieren in der Lage waren. Für Atorvastatin und Lovastatin ist jedoch in stabil mit pXP<sub>2</sub>NOS2(16)Luc transfizierten Gallengangsepithel-Zelllinie AKN1 im Gegensatz dazu eine Steigerung der basalen Luziferaseaktivität nachgewiesen worden (WITTECK, Original-Dissertation, 2000). Dies dürfte dadurch relativiert werden, dass diese Zellen auch in Gegenwart von Cytokinen empfindlicher auf die Statine reagierten als die beiden anderen humanen stabil mit pXP<sub>2</sub>NOS2(16)Luc transfizierten Zelllinien. Während in DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen eine maximale Verstärkung der Cytokin-induzierten iNOS-Promotoraktivität um den Faktor 4 (Abbildung 4-40) nachzuweisen war, war in AKN1 pNOS2(16)Luc-Zellen unter denselben Bedingungen eine Steigerung auf mehr



als das 7-fache durch Atorvastatin oder Lovastatin zu erreichen (WITTECK, 2000).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten: Statine verstärken in den untersuchten humanen und murinen Zellen die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression und NO-Produktion, ohne jedoch selbst eine iNOS-Induktion zu bewirken. Während die Erhöhung der iNOS-mRNA-Expression in DLD1- und AKN1-Zellen wohl überwiegend aus einer gesteigerten iNOS-Promotoraktivität resultiert, ist in A549/8-Zellen vermutlich auch eine erhöhte iNOS-mRNA-Stabilität beteiligt. In DLD1- und A549/8-Zellen zeigten Statine keinen wesentlichen Einfluss auf die basale iNOS-Promotoraktivität.

### **5.2.2 Aufhebung der Statin-vermittelten Superinduktion der iNOS-Expression durch Mevalonat und Geranylgeranylpyrophosphat - nur geringe Reduktion durch Farnesylpyrophosphat - in humanen Zelllinien**

Einige Statine können ihre Wirkung in der durch Mikroorganismen gebildeten Lakton-Form nicht entfalten. Während Atorvastatin durch seine Konformation eines Calcium-Salzes bereits in der aktiven Form vorliegt, wird Lovastatin in wässrigem Medium bzw. nach der alkalische Hydrolyse die intramolekulare zyklische Veresterung aufgehoben und das HMG-CoA-Analogon in die aktive offenkettige Form überführt. Physiologisch wird die Aktivierung der Lakton-Form der Statine nach enteraler Resorption durch Laktonasen (Carboxylesterasen) in den Mikrosomen der humanen Leber katalysiert (HAMELIN & TURGEON, 1998).

Für *in vitro*-Versuche wird Lovastatin üblicherweise vorher chemisch durch alkalische Hydrolyse aktiviert (KITA *et al.*, 1980) und dies wurde auch für die Experimente dieser Arbeit durchgeführt. Allerdings lässt sich vermuten, dass die Laktonform von Lovastatin bereits im Zellkulturmedium oder in den Zellen in die aktive Form umgewandelt werden kann, was durch nicht gezeigte Versuche mit dem unbehandelten Lovastatin-Lakton bestätigt werden konnte. Die Tatsache, dass die Wirkung der als inaktiv geltenden Laktonform als auch die der aktiven hydrolysierten Form ähnlich war, lässt möglicherweise vermuten, dass die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase allein nicht der Grund für die Cytokin-induzierte iNOS-Superinduktion sein könnte. Es bot sich an, die durch die aktive Lovastatin-Form gehemmte Aktivität der HMG-CoA-Reduktase durch Gabe des Endproduktes Mevalonat auszugleichen und so die steigernde Wirkung auf die iNOS-Expression aufzuheben (Abbildung 1-4). Die in DLD1-

Zellen durch 30  $\mu$ M Lovastatin hervorgerufene Superinduktion der iNOS konnte durch gleichzeitige Inkubation mit Mevalonat vollständig unterdrückt werden (Abbildung 4-42). Für die Cytokin-induzierte iNOS Promotoraktivität in DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen konnte ebenso eine Reduktion der Lovastatin-abhängigen iNOS-Promotor-Aktivierung festgestellt werden (Abbildung 4-43). Somit ist dargelegt, dass die Cytokin-induzierte iNOS-Expressionssteigerung und iNOS-Promotoraktivitätserhöhung durch die spezifische Hemmung der HMG-CoA-Reduktase und nicht durch unspezifische Effekte der Statine auf die iNOS-Expression herbeigeführt wird. Allerdings war auch der von Pahan *et al.* beschriebene inhibitorische Effekt von Lovastatin auf die LPS-induzierte iNOS-Expression in Astrozyten der Ratte durch Mevalonat wieder aufhebbar (PAHAN *et al.*, 1997).

Molekulare Modifikationen an kleinen G-Proteinen der Rho-Familie, die direkt zur Funktionalisierung bzw. der Deaktivierung derselben beitragen, stellen verglichen mit den Statinen direktere Möglichkeiten der Rho-Inaktivierung mit Einfluss auf die Expression abhängiger Gene wie das der iNOS dar. Kleine G-Proteine der Rho-Familie werden nicht aktiviert, wenn die für ihre Funktion notwendige Prenylierung fehlt (GGPP/FPP als Donatoren der Prenylgruppe) oder wenn sie direkt durch Toxine wie dem Toxin B aus *Clostridium difficile* (Glucosylierung an Tyr-37; dem aktiven Zentrum, siehe Kap. 5.2.2) inaktiviert werden. Kleine G-Proteine können nur als molekulare Schalter in der Signalweiterleitung vom membranständigen Rezeptor zum Zellkern (Ort der Transkription) fungieren, wenn diese aus dem Zytosol an die Zellmembran transloziert werden. Wird die über lange lipophile Kohlenstoffketten vermittelte Membranverankerung verhindert, verlieren Ras und Rho ihre Aktivierbarkeit (GIBBS & OLIFF, 1997). Da Statine über die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zu einer Verarmung an Mevalonat, dem Ausgangsprodukt der FPP- und GGPP-Biosynthese führen, inhibieren sie gleichermaßen die vorwiegend farnesylierten Ras-Proteine und die hauptsächlich geranylgeranylierten Rho-Proteine (Abbildung 5-4). Wird jedoch das Medium während der Behandlung der Zellen mit einem Statin unter Abnahme der Mevalonatbildung gleichzeitig mit einem der beiden Isoprenoid-Pyrophosphate (FPP oder GGPP) versetzt, so kann dies in einer Aufhebung der Statin-Wirkung durch Rekompensation resultieren. Substituiert man nun während der Statin-Behandlung einzeln entweder FPP oder GGPP, so lässt man selektiv die Farnesylierung bzw. die Geranylgeranylierung wieder zu und kann somit zwischen Ras- und Rho-abhängigen Signaltransduktionswegen differenzieren. Ras-Proteine werden vorwiegend durch FPP (COHEN *et al.*, 200; TAHIR *et al.*, 2000) und Rho-

Proteine vor allem durch GGPP aktiviert und an der Zellmembran verankert (LAUFS *et al.*, 1999 ; TANAKA *et al.*, 1998). Die unterschiedliche Bedeutung dieser Isoprenylpyrophosphate für die Aktivierung kleiner G-Proteine wurde im Rahmen dieser Arbeit in humanen DLD1-Zellen untersucht und gezeigt, dass die Statin-vermittelte Superinduktion der iNOS-mRNA-Expression nicht durch FPP dafür aber durch GGPP wieder aufhebbar war. Die durch 30  $\mu$ M Lovastatin erreichte deutliche Steigerung der iNOS-mRNA-Expression konnte in Gegenwart von 10  $\mu$ M GGPP nahezu vollständig unterdrückt werden, wohingegen mit 10  $\mu$ M FPP nur eine sehr geringe Reduktion erzielt wurde (Abbildung 4-44). Auch in DLD1pNOS2(16)Luc-Zellen wurde die durch Lovastatin vermittelte Superinduktion der iNOS-Promotoraktivität bei Koinkubation mit 10  $\mu$ M GGPP nahezu komplett aufgehoben und mit 10  $\mu$ M FPP nur wenig vermindert (Abbildung 4-45). Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass für die Statin-vermittelte Superinduktion der iNOS-Expression geranylgeranylierte Proteine die größere Rolle spielen. Da Rho-Proteine vorwiegend geranylgeranyliert werden, scheint ihre Hemmung eine Verstärkung der Cytokin-induzierten iNOS-Expression zu bewirken. Farnesylierte Proteine sind anscheinend an der Statin-vermittelten Superinduktion der iNOS nicht von Bedeutung. Die negative Regulation der iNOS-Expression durch geranylgeranylierte Proteine konnte durch Finder *et al.* bei der Untersuchung der IL-1 $\beta$ -induzierten iNOS-Expression in VSMC-Zellen der Ratte nachweisen, da die Lovastatin-vermittelte Superinduktion sich durch Geranylgeraniol, nicht jedoch durch Farnesol aufheben ließ. Zudem führte der Geranylgeranyltransferase-Inhibitor GGTI-298 zu einer Superinduktion der IL-1 $\beta$ -induzierten iNOS-Expression (FINDER *et al.*, 1997). Die inhibitorische Wirkung von Lovastatin auf die iNOS-Expression, die Pahan *et al.* in LPS-induzierten primären Astrozyten der Ratte beschrieben hatte, wurde durch FPP verhindert (PAHAN *et al.*, 1997). Sowohl die IL-1 $\beta$ -induzierte iNOS-Expression der VSMC-Zellen als auch die LPS-induzierte der primären Astrozyten (PAHAN *et al.*, 1997) konnte durch dominant-negative Farnesyltransferasen bzw. durch einen Farnesyltransferase-Inhibitor gehemmt werden. So könnte hier geschlussfolgert werden, dass die IL-1 $\beta$ -abhängige iNOS-Induktion in Ratten-Zellen durch farnesylierte Signaltransduktionsproteine wie Ras vermittelt wird. Die Tatsache, dass in der humanen DLD1-Zellen nach Gabe von Mevalonat oder GGPP allein keine Hemmung der Cytokin-induzierten iNOS-Expression aufwies (Abbildung 4-48; Abbildung 4-49), kann bedeuten, dass die Zellen in Medium bereits im aktivierten Zustand befinden, d.h. die kleinen G-Proteine der Rho-Familie bereits maximal geranylgeranyliert vorliegen.

Als Schlussfolgerung lässt sich sagen, dass sich die Statin-vermittelte Superinduktion der iNOS-Expression in humanen Zellen durch gleichzeitige Inkubation mit Mevalonat oder GGPP, nicht jedoch mit FPP, wieder vollständig aufheben lässt. Sie ist somit das Ergebnis einer spezifischen Hemmung der HMG-CoA-Reduktase und beruht auf der Inhibierung geranylgeranylierter Proteine. Vor dem Hintergrund, dass kleine G-Proteine der Rho-Familie im Rahmen der posttranslationalen Modifikation vorwiegend geranylgeranyliert werden, lässt sich daraus ableiten, dass die Cytokin-induzierte iNOS-Expression durch Rho negativ reguliert wird.

### **5.2.3 Steigerung der Cytokin-induzierten iNOS-Expression durch *Clostridium difficile* Toxin B-vermittelte direkte Rho-Hemmung in humanen und murinen Zelllinien**

Zwar werden Ras-Proteine vorwiegend farnesyliert und Rho-Proteine hauptsächlich geranylgeranyliert (DENHARDT *et al.*, 1996), es gibt jedoch auch Ausnahmen. Beispielsweise erwiesen sich RhoB (ADAMSON *et al.*, 1992) und Ki-Ras 4B (LERNER *et al.*, 1995) als sowohl geranylgeranylier- als auch farnesylierbar (CASEY *et al.*, 1994). Somit erschien es notwendig, die aufgestellte Hypothese, dass kleine G-Proteine der Rho-Familie die Cytokin-induzierte iNOS-Expression in humanen Zellen negativ regulieren, durch einen zweiten, unabhängigen Ansatz zu sichern. Hierfür bot sich *Clostridium difficile* Toxin B an, welches von den Zielzellen durch Endozytose aufgenommen wird. Im Endosom kommt es infolge einer Ansäuerung (ATP-getriebene Protonen-Pumpe, hemmbar durch BafilomycinA) im Inneren zur Abgabe des festgehaltenen Toxin B in das Zytosol, wo es seine Wirkung entfalten kann (BARTH *et al.*, 2001). Diese Translokation wird von der  $\beta$ -Kern-Einheit in Verbindung mit der  $\gamma$ -Untereinheit bewerkstelligt, während die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit des Toxins für die UDP-Glucosylierung sämtlicher Rho-Proteine (Rho, Rac und Cdc42) am Tyr-37 verantwortlich ist. Diese werden direkt inaktiviert, die Aktivität der Ras-Proteine bleibt unbeeinflusst (BARTH *et al.*, 1998). Toxin B war in der Lage, die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in humanen DLD1- und A549/8-Zellen um mindestens den Faktor 3 zu erhöhen. Nach Betrachtung der Konzentrations-Wirkungskurven für die beiden Zelllinien ist eine Verschiebung der Kurve der DLD1-Zellen zu höheren Toxin B-Konzentrationen als bei A549/8-Zellen festzustellen (Abbildung 4-47; Abb. 4-48). Wahrscheinlich liegt dies am Aufrei-

nigungsgrad der beiden verwendeten unterschiedlichen Toxin B-Chargen mit geringerer Wirksamkeit pro Gewichtseinheit für die DLD1-Zellen. In murinen Balb3T3-Zellen erhöhte Wirksamkeit pro Gewichtseinheit für die DLD1-Zellen. In murinen Balb3T3-Zellen erhöhte sich die TNF- $\alpha$ -induzierte iNOS-mRNA-Expression nach ToxinB-Behandlung sogar maximal um das 8-fache (Abbildung 4-50). In Untersuchungen die iNOS-Promotoraktivität betreffend wurde keine wesentliche Beeinflussung der Promotoraktivität durch Toxin B in den untersuchten humanen Zelllinien gefunden (Abbildung 4-49). In AKN1pNOS2(16)Luc-Zellen konnte jedoch eine maximal 2,5-fache Superinduktion der iNOS-Promotoraktivität konstatiert werden (WITTECK, 2000). Hier kann demnach eine Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen nicht ausgeschlossen werden.

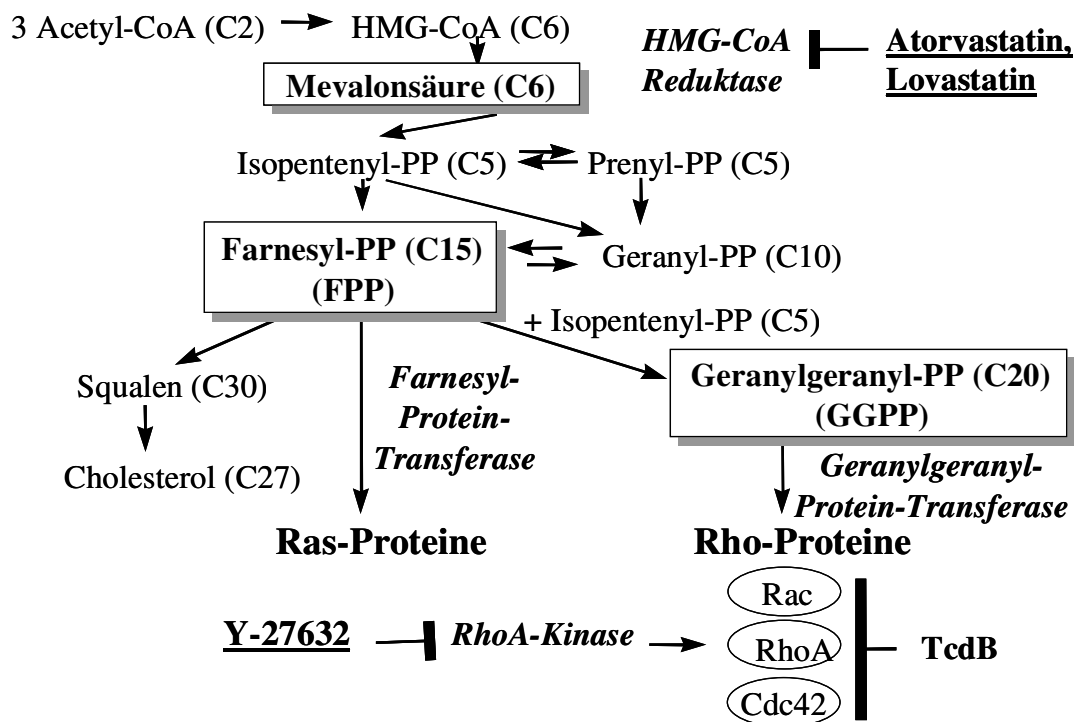
Das Gesamtbild der Resultate aller Arbeitsgruppen, die sich mit der Wirkung von Statinen auf die iNOS-Expression in Ratten-Zellen beschäftigt haben (FINDER *et al.*, 1997; MUNIYAPPA *et al.*, 2000; PAHAN *et al.*, 1997), zeigt bislang unterschiedliche Wirkungen nach Cytokin-induzierter Statin-Wirkung. Allerdings konnten *Muniyappa et al.* in bezug auf die Toxin B-Wirkung in VSMC-Zellen der Ratte nicht nur eine Toxin B-vermittelte Steigerung der IL-1 $\beta$ -induzierten iNOS-Expression, sondern auch eine IL-1 $\beta$ -unabhängige Induktion der iNOS-Expression durch Toxin B beobachten (MUNIYAPPA *et al.*, 2000). Während die erste Beobachtung, also die Superinduktion der iNOS durch die Behandlung mit Mevastatin deckungsgleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist, steht die unter basalen Bedingungen mit dem Statin erfolgte iNOS-Induktion mit diesen im Widerspruch. Denn, wie schon Atorvastatin und Lovastatin, hatte Toxin B in humanen DLD1- und A549/8-Zellen keine Wirkung auf die basal nicht vorhandene iNOS-Induktion. Begründet werden könnten diese widersprüchlichen Ergebnisse damit, dass in Ratten- und humanen Zellen unterschiedliche Signaltransduktionswege zur iNOS-Induktion führen, die unterschiedlich stark auf den Induktor IL-1 $\beta$  reagieren. Das zur Induktion der iNOS in den humanen DLD1- und A549/8-Zellen verwendete Cytokingemisch enthält unter anderen Cytokinen auch IL-1 $\beta$ , allein durch IL-1 $\beta$  ist die iNOS jedoch - im Unterschied zu den VSMC-Zellen der Ratte - in keiner der beiden humanen Zelllinien induzierbar (KLEINERT *et al.*, 1998). Für das Geschwisterenzym der iNOS, der eNOS, war es gelungen, nachzuweisen, dass es sich bei dem geranylgeranylierten Protein, das die Stabilität der mRNA der eNOS negativ reguliert, um Rho handelt. Dies geschah allerdings nicht unter der Verwendung von Toxin B, sondern unter der

von "*E. coli* cytotoxic necrotizing factor" (CNF)-1, einem spezifischen Rho-Aktivator (LAUFS & LIAO, 1998). Daraus ist zu schließen, dass die jeweils beobachteten Effekte auf einer spezifischen Hemmung des Rho-Subtyps Rho (nicht Rac oder Cdc42) beruhen.

In humanen A549/8- und DLD1-Zellen konnte von Witteck (*Original-Dissertation*, 2000) eine konzentrationsabhängige Steigerung der iNOS-Expression nach Behandlung der Zellen mit dem RhoA-Kinase-Inhibitor Y-27632 (ISCHIZAKI *et al.*, 2000) festgestellt werden. Y-27632 hemmt spezifisch die p160-Rho-Kinase, die nur von Rho-Proteinen nicht aber von Rac oder Cdc42 aktiviert wird. Die anfänglich nur mit RhoA angenommene Interaktion der p160 RhoA-Kinase (LEUNG *et al.*, 1995) als deren Spezifikum musste nach Untersuchungen mit den verwandten Formen Rho B und Rho C, die ebenso mit Y-27632 interagieren, korrigiert werden. Keine Interaktionen wurden jedoch mit den Rac- und Cdc42-Proteinen festgestellt (LEUNG *et al.*, 1996).

Somit lässt der RhoA-Kinase-Inhibitor Y-27632 keine weitere Differenzierung zwischen den untereinander eine Sequenzidentität von 85-90 % (LEUNG *et al.*, 1996) aufweisenden Proteinen RhoA, RhoB und RhoC zu. Daraus folgt, dass die Hemmung von Rho (A, B, C) und nicht von Rac oder Cdc42 die Verstärkung der Cytokin-induzierten iNOS-Expression vermittelt. Dies geht mit den Ergebnissen von Muniyappa und Mitarbeitern konform, die in IL-1 $\beta$ -induzierten VSMC-Zellen der Ratte in Gegenwart von C3 eine Steigerung der iNOS-Expression verzeichneten (MUNIYAPPA *et al.*, 2000).

Unter Einsatz von *Clostridium difficile* Toxin B konnte somit die Hypothese, dass es sich bei dem geranylgeranylierten Protein - dessen Hemmung eine Verstärkung der Cytokin-induzierten iNOS-Expression in humanen Zellen bewirkt - um ein kleines G-Protein der Rho-Familie handelt, verifiziert werden.



**Abbildung 5-2: Einfluss von Atorvastatin und Lovastatin auf die Biosynthese von Mevalonat, Farnesyl- und Geranylgeranylpyrophosphat, Wirkung von Toxin B.** Statine (HMG-CoA-Reduktase-Hemmer) verhindern - über eine durch Mangel an Mevalonat verursachte Blockade der FPP- und GGPP-Biosynthese - die für die Membranverankerung essentielle Farnesylierung der Ras- und Geranylgeranylierung der Rho-Proteine. Clostridium difficile Toxin B (TcdB) ist eine Glucosyltransferase, die durch UDP-Glucosylierung sämtliche kleine G-Proteine der Rho-Familie (Rac, Rho, Cdc42) direkt inaktiviert, ohne einen Einfluss auf Ras-Proteine auszuüben.

Die in Gegenwart des RhoA-Kinase-Inhibitors Y-27632 beobachtete deutliche Steigerung der iNOS-mRNA-Expression in den humanen DLD1- und A549/8-Zellen lässt eine Spezifizierung auf die Rho-Subfamilie Rho (A, B, C) zu und spricht gegen eine Beteiligung der beiden anderen Subtypen Rac und Cdc42. Gleichwohl muss im Auge behalten werden, dass es sowohl innerhalb der Rho-Familie, d.h. zwischen Rho, Rac und Cdc42, als auch zwischen der Rho- und der Ras-Familie durchaus Quervernetzungen – einen Crosstalk - gibt (LIM *et al.*, 1996; DENHARDT *et al.*, 1996).

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Zusammenfassung „Isolierung von transkriptionell wirksamen Inhibitoren der humanen iNOS aus Pilzen“

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erstens aus Pilzen Verbindungen isoliert, die durch die Hemmung des JAK2-STAT-1 $\alpha$ -Signalweges die Induktion der iNOS-Expression in A549/8-Zellen negativ beeinflussen. Es konnten drei Verbindungen aus unterschiedlichen *Penicillium*-Stämmen isoliert werden, die durch Reporter-gen-Analysen betreffend der Wirkung der Rohfermentationsprodukte auf die iNOS-, eNOS-Promotor-Aktivität sowie der STAT-1 $\alpha$ -abhängigen Promotor-Aktivität selektiert wurden. Die Substanzen Sporogen-A01, S-Curvularin sowie S14-95 zeigten in den Reporter-gen-Analysen ähnliche Aktivitäten, die sich nur in der Potenz unterschieden. In der Wirkungsspezifität auf Transkriptionsfaktoren, die bei der Aktivierung der iNOS eine Rolle spielen, ergaben sich jedoch große Unterschiede. Während Sporogen-A01 und S-Curvularin auch eine, wenn auch konzentrations-unabhängige, Hemmung auf die NF- $\kappa$ B-abhängige Promotor-Aktivität in HeLa-S3-Zellen zeigten, so ergab sich für S14-95 kein Einfluss auf diesen Signaltransduktionsweg. Bei S14-95 scheint es sich um eine spezifisch die IFN- $\gamma$ -abhängigen Wege der transkriptionellen Aktivierung der iNOS hemmende Verbindung zu handeln. NFAT könnte als regulierender Faktor auch eine Rolle zu spielen, da der NFAT-abhängige Promotor in humanen Zellen durch S14-95 stark inhibiert wurde. Die Effekte dieser Substanz auf den humanen TNF- $\alpha$ -Promotor liegen wie auch für S-Curvularin bei 80% Hemmung und auch der humane COX-2-Promotor wurde durch alle drei Substanzen in Reporter-gen-Analysen stark gehemmt. In A549/8-Zellen zeigten die Substanzen geringe Wirkung auf die Zellproliferation während in HeLa-S3-Zellen in höheren Substanzkonzentrationen eine Proliferationshemmung bzw. Zytotoxizität festgestellt wurde. Das würde die in den transienten Reporter-gen-Analyse aufgetretene konzentrations-unabhängige Promotor-Hemmung (NF- $\kappa$ B, COX-2) zumindest zum Teil erklären.



## **6.2 Zusammenfassung „Negative Regulation der iNOS-mRNA-Synthese durch kleine G-Proteine der Rho-Familie“**

Zweitens wurde in humanen Zellen DLD1, Kolon-Adenokarzinom-Zellen, und A549/8-Zellen die Regulation der iNOS-Expression durch kleine G-Proteine der Ras- und der Rho-Familie, die bekanntermaßen in den Signaltransduktionsweg von Cytokinen involviert sind, untersucht. Atorvastatin und Lovastatin (HMG-CoA-Reduktase-Hemmer), die Ras- und Rho-Proteine gleichermaßen indirekt hemmen, indem sie ihre essentielle Membranverankerung verhindern, erhöhten die Cytokin-induzierte NO-Produktion und iNOS-mRNA-Expression in den untersuchten humanen Zellen auf das 2-4-fache, ohne jedoch selbst die Expression der iNOS induzieren zu können. DLD1- und AKN1-Zellen, die stabil mit einem 16kb-Fragment des humanen iNOS-Promotors vor einem Luziferase-Reportergen (pXP<sub>2</sub>NOS2(16)Luc) transfiziert worden waren, zeigten in Gegenwart von Atorvastatin oder Lovastatin eine mehr als 2,5fache Steigerung der Cytokin-induzierten Luziferaseaktivität, was für eine erhöhte Transkriptionsrate als Ursache der erhöhten iNOS-mRNA-Spiegel spricht. In ebenfalls stabil mit pXP<sub>2</sub>NOS2(16)Luc transfizierten A549/8-Zellen erhöhten die beiden Statine die Luziferaseaktivität dagegen in einem weitaus geringerem Maße, so dass in diesen Zellen eine Beteiligung posttranskriptioneller Mechanismen, im Sinne einer erhöhten iNOS-mRNA-Stabilität, anzunehmen ist. Die beobachtete Statin-vermittelte Verstärkung der Cytokin-induzierten iNOS-mRNA-Expression und iNOS-Promotoraktivität konnte durch Substitution von Mevalonat und Geranylgeranylpyrophosphat wieder vollständig aufgehoben werden, während die Koinkubation mit FPP nur eine geringfügige Reduktion zur Folge hatte. Die Superinduktion war somit das Ergebnis einer spezifischen Hemmung der HMG-CoA-Reduktase und beruhte auf der Hemmung posttranslational geranylgeranylierter Proteine. Vor dem Hintergrund, dass die kleinen G-Proteine der Rho-Familie vorwiegend geranylgeranyliert und die der Ras-Familie hauptsächlich farnesyliert werden, scheint die Cytokin-induzierte iNOS-Expression durch Rho-Proteine negativ reguliert zu werden. Diese Hypothese konnte dadurch verifiziert werden, dass auch *Clostridium difficile* Toxin B - das durch UDP-Glucosylierung sämtliche Rho-Proteine (Rho, Rac, Cdc42) direkt inaktiviert, Ras-Proteine jedoch unbeeinflusst lässt - die Cytokin-induzierte iNOS-mRNA-Expression in den humanen Zellen auf mehr als das Dreifache zu steigern vermochte.

7 **Literaturverzeichnis**

- ABE, K., PAN. H., WATANBE, M., KONNO, H., KATO, T. & ITOYAMO, Y. (1997), Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurological research*, Vol. 19, S. 124-128.
- ADAMSON, P., MARSHALL, C. J., HALL, A. & TILBROOK, P. A. (1992), Post-translational modifications of p21rho proteins. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 267, S. 20033-20038.
- ALONSO, S., MINTY, A., BOURLET, Y. & BUCKINGHAM, M. (1986), Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. *J Mol Evol*, Vol. 23, 1, S. 11-22.
- AMBS, S., OGUNFUSIKA, M. O., MERRIAM, W. G., BENNETT, W. P., BILLIAR, T. R., HARRIS, C. C. (1998), Upregulation of inducible nitric oxide synthase expression in cancer-prone p53 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 95, S. 8823-8828.
- ARMOUR, K. E. & RALSTON, S. H. (1998), Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology*, Vol. 139, S. 799-802.
- BAGASRA, O., MIACHAELS, F. H., ZHENG, Y. M., BOBROSKI, L. E., SPITSIN, S. V., FU, Z. F., TAWADROS, R. & KOPROWSKI, H. (1995), Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 92, S. 12041-12045.
- BANDALETOVA, T., BROUET, I., BARTSCH, H., SUGIMURA, T., ESUMI, H. & OHSHIMA, H. (1993), Immunohistochemical localization of an inducible form of nitric oxide synthase in various organs of rats treated with propionibacterium-acnes and lipopolysaccharide. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, Vol. 101, S. 330-336.
- BARNES, P. J. (1996), NO or no NO in asthma?, *Thorax*, Vol. 51, S. 218-220.
- BARTH, H., HOFFMANN, F., OLENIK, C., JUST, I. und AKTORIES, K. (1998), The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infection and immunity* Vol. 66, S. 1364-1369.
- BARTH, H., PFEIFER, G., HOFMANN, F., MAIER, E., BENZ, R., und AKTORIES, K. (2001), Low pH-induced formation of ion channels by *clostridium difficile* toxin B in target cells. *J Biol Chem.*, Vol 276, 14, S. 10670-10676.
- BERG D.R., SMITH J.E. & HARVEY L. (1993). In *Drugs from Natural Products* (Herausgeber: A. L. Harvey, E. Horwood, NY), Vol. 3, S. 18-34.

- BERRIDGE, M.V., TAN, A.S. (1993), Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, Vol. 303, 2, S. 474-482.
- BOEHM, U., KLAMP, T., GROOT, M. & HOWARD, J. C. (1997), Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annual review of immunology*, Vol. 15, S. 749-795.
- BOGDAN, C., VODOVOTZ, Y., PAIK, J., XIE, Q. W. & NATHAN, C. (1994), Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *Journal of leukocyte biology*, Vol. 55, S. 227-233.
- BOHLINGER, I., LEIST, M., BARSIG, J., UHLIG, S., TIEGS, G. & WENDEL, A. (1995), Interleukin-1 and nitric oxide protect against tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced liver injury through distinct pathways. *Hepatology*, Vol. 22, S. 1829-1837.
- BOISSEL, J.-P., SCHWARZ, P. M., FÖRSTERMANN, U. (1998), Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation. *Nitric oxide: biology and chemistry*, Vol. 2, S. 337-349.
- BOROVKOV, A. Y. & RIVKIN, M. I. (1997), XcmI-containing vector for direct cloning of PCR products. *Bio Techniques*, Vol. 22, S. 812-814.
- BOTTALICO A., FRISULLO S., LERARIO P., RADAZZO G. & CAPASSO R. (1982), Identification of phenolone as a wilt toxin *Phoma destructiva*. *Phytopathologica mediterranea*, 21, S. 39-40.
- BRADFORD, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, Vol. 72, S. 248-254.
- BRACHER F. & SCHULTE, B. (1995), A chemoenzymatic synthesis of the macrocyclic lactone (S)-curvularin. *Natural Product Letters*, Vol. 7, S. 65.
- BREDEL, M., POLLACK, I. F., FREUND, J. M., HAMILTON, A. D. & SEBIT, S. M. (1998), Inhibition of Ras and related G-proteins as a therapeutic strategy for blocking malignant glioma growth. *Neurosurgery*, Vol. 43, S. 124-132.
- BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. (1990), Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 87, S. 682-685.
- BUSSE, R. & MÜLSCH, A. (1990), Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS letters*, Vol. 275, S. 87-90.
- CAPUT, D., BEUTLER, B., HARTOG, K., THAYER, R., BROWN-SHIMER, S. & CERAMI, A. (1986), Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 83, S. 1670-1674.
- CASEY, P. J. & SEABRA, M. C. (1996), Protein prenyltransferases. *J Biol Chem* Vol. 271, 10, S. 5289-5292.

- CETKOVIC-CVRLJE, M., SANDLER, M. & EIZIRIK, D. L. (1993), Nicotinamide and dexamethasone inhibit interleukin-1-induced nitric oxide production by RINm5F cells without decreasing messenger ribonucleic acid expression for nitric oxide synthase. *Endocrinology*, Vol. 133, S. 1739-1743.
- CHARLES, I. G., PALMER, R. M. J., HICKERY, M. S., BAYLISS, M. T., CHUBB, A. P., HALL, V. S., MOSS, D. W. & MONCADA, S. (1993), Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 90, S. 11419-11423.
- CHEN, C., SUN, Y., CHEN, J. & CHIU, K. (2000), TNF- $\alpha$ -Induced Cyclooxygenase-2 Expression in Human Lung Epithelial Cells: Involvement of the Phospholipase C-g2, Protein Kinase C- $\alpha$ , Tyrosine Kinase, NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase, and I- $\kappa$ B Kinase 1/2 Pathway. *J Immunol*, Vol. 165, S. 2719-2728.
- CHINJE, E. C. & STRATFORD, I. J. (1997), Role of nitric oxide in growth of solid tumors: a balancing act. *Essays in biochemistry*, Vol. 32, S. 61-72.
- CHU, S. C., MARKS KONCZALIK, J., WU, H. P., BANKS, T. C. & MOSS, J. (1998), Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 248, 189, S. 871-878.
- COHEN, L.H., PIETERMAN, E., van LEEUWEN, R.E., OVERHAND, M., BURM, B.E., van der MAREL, G.A., und van BOOM, J.H. (2000), Inhibitors of prenylation of Ras and other G-proteins and their application as therapeutics. *Biochem Pharmacol.*, Vol. 60, 8, S. 1061-1068.
- CORBETT, J. A. & MCDANIEL, M. L. (1992), Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of b-cells ? Possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes*, Vol. 41, S. 897-903.
- CORDEIRO, R.F. & SAVARESE, T.M. (1986), Role of glutathione depletion in the mechanism of action of N-methylformamide and N,N-dimethylformamide in a cultured human colon carcinoma cell line. *Cancer Res.*, Vol. 46, S. 1297-1305.
- CREWS, P., JASPARS M. & RODRIGUEZ J. (1998), *Organic structure analysis*. Oxford, Oxford University Press.
- CROSS, J.V., DEAK, J.C., RICH, E.A., QJAN, Y., LEWIS, M., PARROTT, L.A., MOCHIDA, K., GUSTAFSON, D., VANDE POL, S. & TEMPELTON, D.J. (1999), Quinone reductase inhibitors block SAPK/JNK and NF $\kappa$ B pathways and potentiate apoptosis. *J Biol Chem.*, Vol. 274, S. 31150-31154.
- CUNHA, F. Q., MONCADA, S. & LIEW, F. Y. (1992), Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- $\gamma$  in murine macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 182, S. 1155-1159.
- DAI, A., ZHANG, Z. & NIU, R. (1995), The effects of hypoxia on nitric oxide synthase activity and mRNA expression of pulmonary artery endothelial cells in pig. *Chung-hua chieh ho ho hu hsi tsa chih*, Vol. 18, S. 164-166.

- DE GROOT, C. J., RUULS, S. R., THEEUWES, J. W., DIJKSTRA, C. D. & VAN DER VALK, P. (1997), Immunocytochemical characterization of the expression of inducible and constitutive isoforms of nitric oxide synthase in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, Vol. 56, S. 10-20.
- DE VERA, M. E., SHAPIRO, R. A., NÜSSLER, A. K., MUDGETT, J. S., SIMMONS, R. L., MORRIS, S. M., BILLIAR, T. R. & GELLER, D. A. (1996), Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 93, S. 1054-1059.
- DE VERA, M. E., TAYLOR, B. S., WANG, Q., SHAPIRO, R. A., BILLIAR, T. R. & GELLER, D. A. (1997), Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I-kB- $\alpha$  and inhibiting NF-kB. *American journal of physiology*, Vol. 273, S. G1290-G1296.
- DENHARDT, D. T. (1996), Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signaling. *The Biochemical journal*, Vol. 318, S. 729-747.
- DINERMAN, J. L., DAWSON, T. M., SCHELL, M. J., SNOWMAN, A. & SNYDER, S. H. (1994), Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: Implications for synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 91, S. 4214-4218.
- DING, A., NATHAN, C. F., GRAYCOR, J., DERYNCK, R., STUEHR, D. J. & SRIMAL, S. (1990), Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- $\beta$  1, - $\beta$  2 and - $\beta$  3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- $\gamma$ . *Journal of immunology*, Vol. 145, S. 940-944.
- DI-POI, N., FAURE, J., GRIZOT, S., MOLNAR, G., PICK, E., & DAGHER, M.C. (2001), Mechanism of NADPH oxidase activation by the Rac/Rho-GDI complex. *Biochemistry*, Vol. 40, S. 10014-10022.
- DREYFUSS, M., HÄRRI, H., HOFMANN, H., KOBEL, H., PACHE, W. & TSCHERTER, H. (1976), Cyclosporin A and C. *European Journal of Applied Microbiology*, Vol. 3, S. 125-133.
- DONG, Z. Y., QI, X. O., XIE, K. P. & FIEDLER, I. J. (1993), Protein tyrosine kinase inhibitors decrease induction of nitric oxide synthase activity in lipopolysaccharide-responsive and lipopolysaccharide-nonresponsive murine macrophages. *Journal of immunology*, Vol. 151, S. 2717-2724.
- DUEÑAS-GONZALEZ, A., ISALES, C. M., DEL MAR ABAD-HERMANDEZ, M., GONZALES-SARMIENTO, R., SANGUEZA, O. & RODRIQUEZ-COMMES, J. (1997), Expression of inducible nitric oxide synthase in breast cancer correlates with metastatic disease. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.*, Vol. 10, S. 645-649.
- EBERHARDT, W., KUNZ, D. & PFEILSCHIFTER, J. (1994), Pyrrolidine dithiocarbamate differentially affects interleukin-1 $\beta$ - and cAMP-induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 200, S. 163-170.

- EBERHARDT, W., PLUSS, C. HUMMEL, R. & PFEILSCHIFTER, J. (1998), Molecular mechanisms of inducible nitric oxide synthase gene expression by IL-1b and cAMP in rat mesangial cells. *Immunology letters*, Vol. 160, S. 4961-4969.
- EICHEL-STREIBER, v. C., BOQUET, P., SAUERBORN, M. & THELESTAM, M. (1996), Large clostridial cytotoxins- a family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. *Trends in Microbiology*, Vol. 4, 10, S. 375-382.
- ERKEL, G, ANKE, T & STERNER, O. (1996), Inhibition of NF-kappa B activation by panepoxydone. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 226, 1, S. 214-221.
- ESSIG, M., NGUYEN, G., PRIE, D., ESCOUBET, B., SRAER, J.-D. & FRIEDLANDER, G. (1998), 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells: role of geranylgeranylation and rho proteins. *Circulation research*, Vol. 83, S. 683-690.
- EXTON, J. H. (1998), Small GTPases Minireview Series. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 273, S. 19923.
- FAN, X. C. & STEITZ, J. A. (1998), Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J*, Vol. 17,S. 3448-60.
- FINDER, J. D., LITZ, J. L., BLASKOVICH, M. A.; MCGUIRE, T. F., QIAN, Y. M., HAMILTON, A. D., DAVIES, P. & SEBIT, S. M. (1997), Inhibition of protein geranylgeranylation causes a superinduction of nitric-oxide synthase-2 by interleukin-1b in vascular smooth muscle cells.  
*The Journal of biological chemistry*, Vol. 272, S. 13484-13488.
- FLETCHER, B. S., KUJUBU, D. A., PERRIN, D. M. & HERSCHMAN, H. R. (1992), Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a function prostaglandin G/H synthase. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 267, S. 4338.
- FORRESTER, K., AMBS, S., LUPOLD, S. E., KAPUST, R. B., SPILLAR, E. A., WEINBERG, W. C., FELLE BOSCO, E., WANG, X. W., GELLER, D. A., TZENG, E., BILLIAR, T. R. & HARRIS, C. C. (1996), Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 93, S. 2442-2447.
- FÖRSTERMANN, U., GORSKY, L. D., POLLOCK, J. S., ISHII, K., SCHMIDT, H. H. H. W., HELLER, M. & MURAD, F. (1990), Hormone-induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin. *Molecular pharmacology*, Vol. 38, S. 7-13.
- FÖRSTERMANN, U., SCHMIDT, H. H. H. W., KOHLHAAS, K. L. & MURAD, F. (1991), Induced RAW 264.7 macrophages express soluble and particulate nitric oxide synthase: inhibition by transforming growth factor-b. *European Journal of Pharmacology*, Vol. 225, S. 161-165.

- FÖRSTERMANN, U., SCHMIDT, H. H. H. W., KOHLHAAS, K. L. & MURAD, F.  
(1992), Induced RAW 264.7 macrophages express soluble and particulate nitric oxide synthase: Inhibition by transforming growth factor- $\beta$ . *European journal of pharmacology*, Vol. 225, S. 161-165.
- FÖRSTERMANN, U., CLOSS, E. I., POLLOCK, J. S., NAKANE, M., SCHWARZ, P.,  
GATH, I. & KLEINERT, H. (1994), Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, Vol. 23, S. 1121-1131.
- FÖRSTERMANN U. & KLEINERT H. (1995), Nitric oxide synthase: expression and  
expressional control of the three isoforms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, Vol. 352, S. 351-364.
- FÖRSTERMANN, U., BOISSEL, J.-P. & KLEINERT, H. (1998), Expressional control of  
the "constitutive" isoforms nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Vol. 12, S. 773-790.
- FRANK, S., KOLB, N., WERNER, E. R. & PFEILSCHIFTER, J. (1998), Coordinated  
induction of inducible nitric oxide synthase and GTP-cyclohydrolase I is dependent on inflammatory cytokines and interferon- $\gamma$  in HaCaT keratinocytes: implications for the model of cutaneous wound repair. *The Journal of investigative dermatology*, Vol. 111, S. 1065-1071.
- FUJHUA, H. G., COMHAIR, S. A. A., ZHENG, S., DWEIK, R. A., EISSA, N. T.,  
THOMASSEN, M. J., CALHOUN, W. & ERZURUM, S. C. (2000), Molecular  
mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *Journal of immunology*, Vol. 164, S. 5970-5980.
- GALEA, E., REIS, D. J. & FEINSTEIN, D. L. (1994), Cloning and expression of inducible  
nitric oxide synthase from rat astrocytes. *Journal of neuroscience research*, Vol. 37, S. 406-414.
- GARCIA-ROMAN, N., ALVAREZ, A.M., TORO, M.J., MONTES, A. & LORENZO, M.J.  
(2001), Lovastatin induces apoptosis of spontaneously immortalized rat brain neuroblasts: involvement of nonsterol isoprenoid biosynthesis inhibition. *Mol Cell Neurosci*, Vol. 17, S. 329-341.
- GATH, I., CLOSS, E. I., GÖDEL-ARMBRUST, U., SCHMITT, S., NAKANE, M.,  
WESSLER, I. & FÖRSTERMANN, U. (1996), Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: implications for contractile function. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Vol. 10, S. 1614-1620.
- GELLER, D. A., LOWENSTEIN, C. J., SHAPIRO, R. A., NUSSLER, A. K.,  
DI SILVIO, M., WANG, S. C., NAKAYAMA, D. K., SIMMONS, R. L.,  
SNYDER, S. H. & BILLIAR, T. R. (1993), Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 90, S. 3491-3495.

- GELLER, D. A. & BILLIAR, T. R. (1998), Molecular biology of nitric oxide synthases. Cancer and metastasis reviews, Vol. 17, S. 7-23.
- GERVAZIEV, IU. V. & SOKOLOV, N. N. (1999), Mechanisms of regulation by calmodulin of nitric oxide synthase. Voprosy meditsinskoi khimii, Vol. 45, S. 187-199.
- GIBBS, J. B. & OLIFF, A. (1997), The potential of farnesyltransferase inhibitors as cancer chemotherapeutics. Annual review of pharmacology and toxicology, Vol. 37, S. 143-166.
- GILBERT, R. S. & HERSCHMAN, H. R. (1993 a), Macrophage nitric oxide synthase is a glucocorticoid-inhibitable primary response gene in 3T3 cells. Journal of cellular physiology, Vol. 157, S. 128-132.
- GILBERT, R. S. & HERSCHMAN, H. R. (1993 b), Transforming growth factor beta differentially modulates the inducible nitric oxide synthase gene in distinct cell types. Biochemical and biophysical research communications, Vol. 195, S. 380-384.
- GOETZ, R. M., MORANO, I., CALOVINI, T., STUDER, R. & HOLTZ, J. (1994), Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. Biochemical and biophysical research communications, Vol. 205, S. 905-910.
- GREEN, L. C., TANNENBAUM, S. R. & Goldmann, P. (1981), Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. Science, Vol. 212, S. 56-58.
- GREEN, S. J., MELLOUK, S., HOFFMAN, S. L., MELTZER, M. S. & NACY, C. A. (1990), Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. Immunology letters, Vol. 25, S. 15-19.
- GUO, F. H., DE RACVE, H. R., RECC, T. W., STUEHR, D. J., THUNNISSEN, F. B. & ERZURUM, S. C. (1995), Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 92, S. 7809-7813.
- GUO, F. H., COMHAIR, S. A. A., ZHENG, S., DWEIK, R. A., EISSA, N. T., THOMASSEN, M. J., CALHOUN, W. & ERZURUM, S. C. (2000), Molecular mechanism of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. Journal of immunology, Vol. 164, S. 5970-5980.
- HAMELIN, B. A. & TURGEON, J. (1998), Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. Trends in pharmacological sciences, Vol. 19, S. 26-37.
- HAMID, Q., SPRINGALL, D. R., RIVERSOS MORENO, V., CHANEZ, P., HOWARTH, P., REDINGTON, A., BOUSQUET, J., GODARD, P., HOLGATE, S. & POLAK, J. M. (1993), Induction of nitric oxide synthase in asthma. Lancet, Vol. 342, S. 1510-1513.



- HANSEN M. B., NIELSEN S. E. & BERG, K. (1989), Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, Vol. 119, 2, S. 203-210.
- HARBRECHT, B. G., WU, B., WATKINS, S. C., BILLIAR, T. R. & PEITZMAN, A. B. (1997), Inhibition of nitric oxide synthesis during severe shock but not after resuscitation increases hepatic injury and neutrophil accumulation in hemorrhaged rats. *Shock*, Vol. 8, S. 415-421.
- HAUSLADEN, A. & STAMLER, J. S. (1998), Nitric oxide in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 95, S. 10345-10347.
- HECKER, M., MÜLSCH, A. & BUSSE, R. (1994), Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *Journal of neurochemistry*, Vol. 62, S. 1524-1529.
- HELLERMANN, G. R. & SOLOMONSON, L. P. (1997), Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 272, S. 12030-12034.
- HEVEL, J. M., WHITE, K. A. & MARLETTA, M. A. (1991), Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 266, S. 22789-22791.
- HIBBS, J. B., WESTERFELDER, C., TAINTOR, R., VAVRIN, Z., KABLITZ, C., BARANOWSKI, R. L., WARD, J. H., MENLOVE, R. L., MCMUNY, M. P., KUSHNER, J. P. & SAMLOWSKI, W. E. (1992), Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *The Journal of clinical investigation*, Vol. 89, S. 867-877.
- HISHIKAWA, K., NAKAKI, T., MARUMO, T., SUZUKI, H., KATO, R. & SARUTA, T. (1995), Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS letters*, Vol. 360, S. 291-293.
- HOFFMAN, R. A., ZHANG, G. S., NUSSLER, N. C., GLEIXNER, S. L., FORD, H. R., SIMMONS, R. L. & WATKINS, S. C. (1997), Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in the mouse ileal mucosa. *American journal of physiology*, Vol. 35, S. G383-G392.
- HORTELANO, S., GENARO, A. M. & BOSCA, L. (1993), Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophages. *FEBS letters*, Vol. 320, S. 135-139.
- HU, J., ROY S. K., SHAPIRO P. S., RODIG S. R., REDDY, S. P. M., PLATANIAS, L. C., SCHREIBER, R. D. & KALVAKOLANU, D.V. (2001), ERK1 and ERK2 activate CCAAAT/Enhancer-binding Protein-b-dependent gene transcription in response to interferon-g. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 276, 1, S. 287-297.
- HUANG, P. L., HUANG, Z. H., MASHIMO, H., BLCH, K. D., MOSKOWITZ, M. A., BEVAN, J. A. & FISHMAN, M. C. (1995), Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, Vol. 377, S. 239-242.

- INOUE H., NOJIMA, H. & OKAYAMA, H. (1990), High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, Vol. 96, 1, S. 23-28.
- INOUE, H., YOKOYAMA, C., HARA, S., TONE, Y. & TANABE, T. (1995), Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 270, 42, S. 24965-24971.
- ISCHIZAKI, T., UEHATA, M. TAMECHIKA, I., KEEL, J., NONOMURA, K., MAEKAWA, M. & NARUMIYA, S. (2000), Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinases. *Molecular pharmacology*, Vol. 57, S. 976-983.
- JANSSENS, S. P., SIMOUCHI, A., QUERTERMOUS, T., BLOCH, D. B. & BLOCH, K. D. (1992), Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 267, S. 14519-14522.
- KAMIJO, R., HARADA, H., MATSUYAMA, T., BOSLAND, M., GERECITANO, J., SHAPIRO, D., LE, J., KOH, S. I., KIMURA, T., GREEN, S. J., MAK, T. W., TANIGUCHI, T. & VILCEK, J. (1994), Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophage. *Science*, Vol. 263, S. 1612-1615.
- KARDINAL, C., KONKOL, B., LIN, H., EULITZ, M., SCHMIDT, E.K., ESTROV, Z., TALPAZ, M., ARLINGHAUS, R.B. & FELLER, S.M. (2001), Chronic myelogenous leukemia blast cell proliferation is inhibited by peptides that disrupt Grb2-SoS complexes. *Blood*, Vol. 98, S. 1773-1781.
- KHARITONOV, S. A., YATES, D. H. & BARNES, P. J.(1996), Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *American journal of respiratory and critical care medicine: an official journal of the American Thoracic Society, medical section of the American Lung Association*, Vol. 153, S. 454.
- KILBOURN, R. G., JUBRAN, A., GROSS, S. S., GIFFITH, O. W., LEVI, R., ADAMS, J. & LODATO, R. F. (1990), Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 172, S. 1132-1138.
- KIM, Y. M., DE VERA, M. E., WATKINS, S. C. & BILLIAR, T. R. (1997), Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 272, S. 1402-1411.
- KIMURA, H., HOKARI, R., MIURA, S., SHIGEMATSU, T., HIROKAWA, M., AKIBA, Y., KUROSE, I., HIGUCHI, H., FUJIMORI, H., TSUZUKI, Y., SERIZAWA, H. & ISHII, H. (1998), Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut*, Vol. 42, S. 180-187.
- KITA, T., BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. (1980), Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in livers of mice treated with mevinolin, a competitive inhibitor of the reductase. *The Journal of clinical investigation*, Vol. 66, S. 1094-1100.

- KITAHARA, T., KIYOTA, H., KURATA, H. & MORI, K. (1991), Synthesis of Oxygenated Eremophilanes, Gigantenone, Phomenone and Phaseolinone, Phytotoxins from Pathogenic Fungi. *Tetrahedron*, Vol. 47, 9, S. 1649-1654.
- KLEINERT, H., EUCHENHOFER, C. IHRIG-BIEDERT, I. & FÖRSTERMANN, U. (1996), In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem*, Vol. 271, S. 6039-6045.
- KLEINERT, H., EUCHENHOFER, C. IHRIG-BIEDERT, I. & FÖRSTERMANN, U. (1996), Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B. *Molecular pharmacology*, Vol. 49, S. 15-21.
- KLEINERT, H., WALLERATH, T., EUCHENHOFER, C., IHRIG-BIEDERT, I., LI, H. & FÖRSTERMANN, U. (1998), Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension*, Vol. 31, S. 582-588
- KLEINERT, H., GELLER, D. A. & FÖRSTERMANN, U. (1999), Analysis of the molecular mechanism regulating the induction of the human NO synthase II promoter in human A549/8 alveolar carcinoma cells. *Naunyn-Schmiedeberg' s archives of pharmacology*, Vol. 359, S. R37
- KOBZIK, L., BREDET, D. S., LOWENSTEIN, C. J., DRAZEN, J., GASTON, B., SUGARBAKER, D. & STAMLER, J. S. (1993), Nitric oxide synthase in human and rat lung - immunocytochemical and histochemical localization. *American journal of respiratory cell and molecular biology: an official journal of the American Thoracic Society, Medical Section of the American Lung Association*, Vol. 9, S. 371-377.
- KOIDE, M., KAWAHARA, Y., NAKAYAMA, I., TSUDA, T. & YOKOYAMA, M. (1993), Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cul-tured vascular smooth muscle cells: Synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 268, S. 24959-24966.
- KOLB-BACHOFEN, V. (1996), Intraislet expression of inducible nitric oxide synthase and islet cell death. *Biochemical Society transactions*, Vol. 24, S. 233-234.
- KOLYADA, A. Y., SAVIKOVSKY, N. & MADIAS, N. E. (1996), Transcriptional regulation of the human iNOS gene in vascular-smooth-muscle-cells and macrophages: evidence for tissue specificity. *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 220, S. 600-605.
- KOSAKA, T., MIYATA, A., IHARA, H., SUGIMOTO, T., TAKEDA, O., TAKASHI, E. & TANABE, T. (1994), Characterization of the human gene (PTGS2) encoding the prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *European Journal of Biochemistry*, Vol. 221, S. 889.
- KRÖNCKE, K. D., FEHSEL, K. & KOLB-BACHOFEN, V. (1998), Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clinical and experimental immunology*, Vol. 113, S. 147-156.

- KUNZ, D., WALKER, G., EBERHARDT, W. & PFEILSCHIFTER, J. (1996), Molecular mechanisms of dexamethasone inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1b-stimulated mesangial cells: evidence for the involvement of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 93, S. 255-259.
- KUNZ, D., WALKER, G., EBERHARDT, W., MESSMER, U. K., HUWILER, A. & PFEILSCHIFTER, J. (1997), Platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor differentially regulate interleukin 1b- and cAMP-induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells. *The Journal of clinical investigation*, Vol. 100, S. 2800-2809
- LAMONTAGNE, D., POHL, U. & BUSSE, R. (1992), Mechanical deformation of vessel wall and shear stress determine the basal release of endothelial-derived relaxing factor in the intact rabbit coronary vascular bed. *Circulation research*, Vol. 70, S. 123-130.
- LANGREHR, J. M., HOFFMAN, R. A., BILLIAR, T. R., LEE, K. K. W., SCHRAUT, W. H. & SIMMONS, R. L. (1991) Nitric oxide synthesis in the in vivo allograft response: a possible regulatory mechanism. *Surgery*, Vol. 110, S. 335-342.
- LAROIA, G., CUESTA, R., BREWER, G. & SCHNEIDER, R. J. (1999), Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, Vol. 84, S. 499-502.
- LAUFS, U. & LIAO, J. K. (1998), Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 273, S. 24266-24271.
- LAUFS, U., ENDRES, M. & LIAO, J. K. (1999), Regulation of endothelial NO production by Rho GTPase. *Med Klin*, Vol. 94, 4, S. 211-218.
- LERNER, E. C., QIAN, Y., HAMILTON, A. D. & SEBTI, S. M. (1995), Disruption of oncogenic K-Ras4B processing and signaling by a potent geranylgeranyltransferase I inhibitor. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 270, S. 26770-26773.
- LEUNG, T., CHEN, X.-Q., MANSER, E. & LIM, L. (1996), The p160 RhoA-binding kinase ROKa is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Molecular and cellular biology*, Vol. 16, S. 5313-5327.
- LI, L. M., KILBOURN, R. G., ADAMS, J. & FIDLER, I. J. (1991), Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer research*, Vol. 51, S. 2531-2535
- LI, J. & BILLIAR, T. R. (1999), Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *American journal of physiology*, Vol. 276, S. G1069-G1073.
- LIAO, J. K., ZULUETA, J. J., YU, F. S., PENG, H. B., COTE, C. G. & HASSOUN, P. M. (1995), Regulation of bovine endothelial constitutive nitric oxide synthase by oxygen. *The Journal of clinical investigation*, Vol. 96, S. 2661- 2666.
- LIM, L., MANSER, E., LEUNG, T. & HALL, C. (1996), Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras-related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways. *European journal of biochemistry*, Vol. 242, S. 171-185.

- LINN, S. C., MORELLI, P. J., EDRY, I., COTTONGIM, S. E., SZABO, C. & SALZMANN, A. L. (1997), Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase gene in an intestinal epithelial cell line. *American journal of physiology*, Vol. 272, S. G1499-1508.
- LINSCHIED, P., SSCHAFFNER, A. & SCHOEDON, G. (1998), Modulation of inducible nitric oxide synthase mRNA stability by tetrahydrobiopterin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 243, 1, S. 137-141.
- LÖFFLER, G. (1997), Endokrine Gewebe I: Grundlagen der endokrinen Regulation von Lebensvorgängen. In: Löffler, G. und Petrides, P. E. (Hrsgbr.) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg und New York, 5. Auflage. S. 761-784.
- LOPEZ-CABRERA, M., NUEDA, A., VARA, J., GARCIA-AGUILAR, J., TUGORES, A. & CORBI, A. L. (1993), Characterization of the p150,95 leukocyte integrin alpha subunit (CD11c) gene promoter. Identification of cis-acting elements. *J Biol Chem*, Vol. 268, S. 1187-1193.
- LOWENSTEIN, C. J., GLATT, C. S., BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. (1992), Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 89, S. 6711-6715.
- LOWENSTEIN, C. J., ALLEY, E. W., RAVAL, P., SNOWMAN, A. M., SNYDER, S. H., RUSSELL, S. W. & MURPHY, W. J. (1993), Macrophage nitric oxide synthase gene-two upstream regions mediate induction by interferon-g and lipopolysaccharide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 90, S. 9730-9734.
- LYONS, C. R., ORLOFF, G. J. & CUNNINGHAM, J. M. (1992), Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 267, S. 6370-6374.
- MACKAY, D. J. G. & HALL, A. (1998), Rho GTPases. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 273, S. 20685-20688.
- MACKENDRICK, W., CAPLAN, M., HSUEH, W. (1993), Endogenous nitric oxide protects against platelet-activating factor-induced bowel injury in the rat. *Pediatric research*, Vol. 34, S. 222-228.
- MACMICKING, J., XIE, Q. W. & NATHAN, C. (1997), Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*, Vol. 15, S. 323-350.
- MAHER, V., SINFUEGO, J., CHAO, P. & PAREKH, J. (1997), Primary prevention of coronary heart disease. What has WOSCOPS told us and what questions remain? *West Of Scotland Coronary Prevention Study. Drugs*, Vol. 54, S. 1-8.
- MARKEWITZ, B. A., MICHAEL, J. R., KOHAN, D. E. (1993), Cytokine-induced expression of a nitric oxide synthase in rat renal tubule cells. *The Journal of clinical investigation*, Vol. 91, S. 2138-2143.
- MARSDEN, P. A., SCHAPPERT, K. T., CHEN, H. S., FLOWERS, M., SUNDELL, C. L., WILCOX, J. N., LAMAS, S. & MICHEL, T. (1992), Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS letters*, Vol. 307, S. 287-293.

- MAYER, B. & WERNER, E. R. (1995), In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, Vol. 351, S. 453-463.
- MCMILLAN, K., BREDET, D. S., HIRSCH, D. J., SNYDER, S. H., CLARK, J. E. & MASTERS, B. S. (1992), Cloned, expressed rat cerebellar nitric oxide synthase contains stoichiometric amounts of heme, which binds carbon monoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 89, S. 11141-11145.
- MERAZ, M. A., WHITE, J. M., SHEEHAN, K. C. F., BACH, E. A., RODIG, S. J., DIGHE, A. S., KAPLAN, D. H., RILEY, J. K., GREENLUND, A. C., CAMPBELL, D., CARVER-MOORE, K., DUBOIS, R. N., CLARK, R., AGUET, M. & SCHREIBER, R. D. (1996), Targeted disruption of the STAT1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, Vol. 84, S. 431-442.
- MESTRE, J.R., MACKRELL, P.J., RIVADENEIRA, D.E., STAPLETON, P.P., TANABE, T. & DALY, J. M. (2001), Redundancy in the signaling pathways and promoter elements regulating cyclooxygenase-2 gene expression in endotoxin-treated macrophage/monocytic cells. *J Biol Chem.*, Vol. 276, S. 3977-3982.
- MOLNAR, G., DAGHER, M.C., GEISZT, M., SETTLEMAN, J. & LIGETI, E. (2001), Role of prenylation in the interaction of Rho-family small GTPases with GTPase activating proteins. *Biochemistry*, Vol. 40, S. 10542-10549.
- MOORE, M. S. (1998), Ran and nuclear transport. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, S. 22857-22860.
- MORI J. & TAMURA, H. (1988), Synthesis of sporogen-A01 (13-deoxyphomenone), a sporogenic sesquiterpene from *Aspergillus oryzae*. *Liebigs Ann Chem*, S. 97-105.
- MOSMANN, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, Vol. 65, 1-2, S. 55-63.
- MULLIGAN, M. S., HEVEL, J. M., MARLETTA, M. A. & WARD, P. A. (1991), Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 88, S. 6338-6342.
- MUNIYAPPA, R., XU, R., RAM, J. L. & SOWERS, J. R. (2000), Inhibition of Rho protein stimulates iNOS expression in rat vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, Vol. 278, S. H1762-H1768.
- MURAD, F. (1998), Nitric oxide signaling: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone? Recent progress in hormone research, Vol. 53, S. 43-59.
- MUTOH, M., TAKAHASHI M., FUKUDA K., MATSUSHIMA-HIBIYA Y., MUTOH H., SUGIMURA T. & WAKABAYASHI K. (2000), Suppression of cyclooxygenase-2-promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells by chemopreventive agents with a resorcin-type structure. *Carcinogenesis*, Vol. 21, 5, S. 959-963.

- MÜLSCH, A., SCHRAY-UTZ, B., MORDVINTCEV, P. I., HAUSCHILDT, S. & BUSSE, R. (1993), Diethyldithiocarbamate inhibits induction of macrophage NO synthase. FEBS letters, Vol. 321, S. 215-218.
- NAKANE, M., SCHMIDT, H. H. H. W., POLLOCK, J. S., FÖRSTERMANN, U. & MURAD, F.(1993), Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. FEBS letters, Vol. 316, S. 175-180.
- NATHAN, C. F. & HIBBS, J. B. (1991), Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. Current opinion in immunology, Vol. 3, S. 65-70.
- NISHIDA, K., HARRISON, D. G., NAVAS, J. P., FISHER, A. A., DOCKERY, S. P., UEMATSU, M., NEREM, R. M., ALEXANDER, R. W. & MURPHY, T. J.(1992), Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. The Journal of clinical investigation, Vol. 90, S. 2092-2096.
- NORDEEN, S. K. (1988), Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. Biotechniques, Vol. 6, 5, S. 454-458.
- NUNOKAWA, Y., ISHIDA, N. & TANAKA, S. (1993), Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. Biochemical and biophysical research communications, Vol. 191, S. 89-94.
- OHASHI, Y., KAWASHIMA, S., HIRATA, K., YAMASHITA, T., ISHIDA, T., INOUE, N., SAKADA, T., KURIHARA, H., YAZAKI, Y. & YOKOYAMA, M. (1998), Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. The Journal of clinical investigation, Vol. 102, S. 2061-2071.
- OKAYAMA Y., HAGAMAN D.D. & METCALFE D.D. (2001), A comparison of mediators released or generated by IFN- $\gamma$ -treated human mast cells following aggregation of Fc $\gamma$ RI or Fc $\epsilon$ RI. J Immunol, Vol. 166, S. 4705-4712.
- OSBORN L., KUNKEL S. & NABEL G.J. (1989), Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. Proc Natl Acad Sci U S A., Vol. 86, 7, S. 2336-2340.
- PAHAN, K., SHEIKH, F.G., NAMBOODIRI, A.M. & SINGH, I.(1997), Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. J Clin Invest, Vol. 100, S. 2671-2679.
- PETROS A., BENNETT D. & VALLANCE P. (1991), Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. Lancet, Vol. 338, S. 1557-1558.
- POLLOCK, J. S., KLINGHOFER, V., FÖRSTERMANN, U. & MURAD, F. (1992), Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. FEBS letters, Vol. 309, S. 402-404.
- POLLOCK, J. S., NAKANE, M., BUTTERY, L. K., MARTINEZ, A., SPRINGALL, D., POLAK, J. M., FÖRSTERMANN, U. & MURAD, F. (1993), Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. American journal of physiology, Vol. 265, S. C1379-C1387.

- PONTE, P., NG, S. Y., ENGEL, J., GUNNING, P. & KEDES, L. (1984), Evolutionary conservation in the untranslated regions of actin mRNAs: DNA sequence of a human beta-actin cDNA. *Nucleic acids research*, Vol. 12, S. 1687-1696
- PUCK et al.(1956), *J. Exp. Med.*, Vol. 103, 273-284.
- REDINBAUGH, M. G. & CAMPBELL, W. H. (1985), Adaptation of the dye-binding protein assay to microtiter plates. *Analytical biochemistry*, Vol. 147, S. 144-147.
- REILING, N., KRONCKE, R., ULMER, A. J., GERDES, J., FLAD, H. D. & HAUSCHILD, S.(1996), Nitric oxide synthase: expression of the endothelial, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent isoform in human B and T lymphocytes. *European journal of immunology*, Vol. 26, S. 511-516.
- RODRIGO, J., RIVEROS MORENO, V., BENTURA, M. L., UTTENTHAL, L. O., HIGGS, E. A., FERNANDEZ, A. P., POLAK, J. M., MONCADA, S. & MARTINEZ MURILLO, R. (1997), Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema, and blood vessels of the rat brain. *The Journal of comparative neurology*, Vol. 378, S. 522-534.
- RORIGUEZ-PASCUAL, F., HAUSDING, M., IHRIG-BIEDERT, I., FURNEAUX, H., LEVY, A. P., FÖRSTERMANN, U & KLEINERT, H. (2000), Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 275, S. 26040-26049.
- ROWINSKY, E. K., WINDLE, J. J. & VON HOFF, D. D. (1999), Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. *J Clin Oncol.*, Vol. 17, S. 3631-3652.
- SACKS, F. M., PFEFFER, M. A., MOYE, L. A., ROULEAU, J. L., RUTHERFORD, J. D., COLE, T. G., BROWN, L., WARNICA, J. W., ARNOLD, J. M., WUN, C. C., DAVIS, B. R., BRAUNWALD, E. (1996), The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *The New England journal of medicine*, Vol. 335, S. 1001-1009.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F & MANIATIS, T. (1998), *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press.
- SANDS, W. A, BULUT, V., SEVEREN, A., XU, D. M. & LIEW, F. Y.(1994), Inhibition of nitric oxide synthesis by interleukin-4 may involve inhibiting the activation of protein kinase C. *European journal of immunology*, Vol. 24, S. 2345-2350.
- SANTINI, G., PATRIGNANI, P., SCIULLI, M.G., SETA, F., TACCONELI, S., PANARA, M.R., RICCIOTTI, E., CAPONE, M.L. & PATRONO, C. (2001), The human pharmacology of monocyte cyclooxygenase 2 inhibition by cortisol and synthetic glucocorticoids. *Clin Pharmacol Ther*, Vol. 70, S. 475-83.
- SASE, K. & MICHEL, T. (1995), Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. *Life sciences*, Vol. 57, S. 2049-2055.



- SAURA, M., MARTINEZDALMAU R., MINTY, A., PEREZSALA, D. & LAMAS, S.  
(1996), Interleukin-13 inhibits inducible nitric oxide synthase expression in human mesangial cells. *The Biochemical journal*, Vol. 313, S. 641-646.
- SCHINI, V. B., DURANTE, W., ELIZONDO, E., SCOTT-BURDEN, T.,  
JUNQUERO, D. C., SCHAFER, A. I. & VANHOUTTE, P. M. (1992), The induction of nitric oxide synthase activity is inhibited by TGF- $\beta$ 1, PDGFAB and PDGFBB in vascular smooth muscle cells. *European journal of pharmacology*, Vol. 216, S. 379-383.
- SCHMIDT, H. H. H. W., POLLOCK, J., NAKANE, M., GORSKY, L.,  
FÖRSTERMANN, U. & MURAD, F. (1991), Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 88, S. 365-369.
- SCHNEIDER, G. (1996), Neue Testsysteme zur Untersuchung antagonistischer Pilze und Sekundärstoffe aus antagonistischen und mycophilen Pilzen. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- SCHWANTES, H.O. (1996), *Biologie der Pilze*, 1. Auflage, UTB Verlag Köln.
- SENNEQUIER, N., WOLAN, D. & STUEHR, D. J. (1999), Antifungal imidazoles block assembly of inducible NO synthase into an active dimer. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 274, S. 930-938.
- SHAUL, P. W., NORTH, A. J., WU, L. C., WELLS, L. B., BRANNON, T. S., LAU, K. S.,  
MICHEL, T., MARGRAF, L. R. & STAR, R. A. (1994), Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *The Journal of clinical investigation*, Vol. 94, S. 2231-2236.
- SHERMAN, P. A., LAUBACH, V. E., REEP, B. R. & WOOD, E. R. (1993), Purification and cDNA sequence of an inducible nitric oxide synthase from a human tumor cell line. *Biochemistry*, Vol. 32, S. 11600-11605.
- SHIRAISHI, A., DUDLER, J. & LOTZ, M. (1997), Role of IFN regulatory factor-1 in synovitis and nitric oxide production. *Journal of immunology*, Vol. 159, S. 3549-3554.
- SIDDHANTA, U., PRESTA, A., FAN, B., WOLAN, D., ROUSSEAU, D. L. &  
STUEHR, D. J. (1998) Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase. Electron transfer occurs between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 273, S. 18950-18958.
- SIEGFRIED, J.M. (1987), Detection of human lung epithelial cell growth factors produced by a lung carcinoma cell line: use in culture of primary solid lung tumors. *Cancer Res*, Vol. 47, 11, S. 2903-2910.
- SILBERBORTH S., STUMPF A., ERKEL G., ANKE T. & STERNER O. (2002),  
Gerronemins A-F, cytotoxic biscatechols from a *Gerronema* species.  
*Phytochemistry*, Vol. 59, S. 643-648.
- SINGER, I. I., KAWKA, D. W., SCOTT, S., WEIDNER, J. R., MUMFORD, R. A., RIEHL,  
T. E. & STENSON, W. F. (1996), Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, Vol. 111, S. 871-885.

- SLICE, L.W., WALSH, J.H. & ROZENGURT, E. (1999), Galpha(13) stimulates Rho-dependent activation of the cyclooxygenase-2 promoter. J Biol Chem., Vol. 274, S. 27562-27566.
- SLICE, L.W., BUI, L., MAK, C. & WALSH, J. H. (2000), Differential regulation of COX-2 transcription by Ras- and Rho-family of GTPases. Biochem Biophys Res Commun, Vol. 276, 2, S. 406-410
- SORELL, T. N., (1988), interpreting organic molecules. Sausalito, USA, University Science Books.
- STICHTENOTH, D. O. & FRÖLICH, J. C. (1998), Nitric oxide and inflammatory joint diseases. British journal of rheumatology, Vol. 37, S. 246-257.
- STUEHR, D. J., CHO, H. H., KWON, N. S., WEISE, M. F. & NATHAN, C. F. (1991), Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 88, S. 7773-7777.
- TAHIR, S. K., GU, W. Z., ZHANG, H. C., LEAL, J., LEE, J. Y., KOVAR, P., SAEED, B., CHERIAN, S. P., DEVINE, E., COHEN, J., WARNER, R., WANG, Y. C., STOUT, D., ARENDSSEN, D. L., ROSEBERG, S. & NG, S. C. (2000), Inhibition of farnesyltransferase with A-176120, a novel and potent farnesyl pyrophosphate analogue. Eur J Cancer., Vol. 36, S. 1161-1170.
- TANAKA, S., WADA, K., KATAYAMA, M. & MARUMO, S. (1984), Isolation of Sporogen-A01, a sporogenic substance, from *Aspergillus oryzae*. Agric Biol Chem, Vol. 48, 12, S. 3189-3191.
- TANAKA T., TATSUNO I., NOGUCHI Y., UCHIDA D., OEDA T., NARUMIYA S., YASUDA T., HIGASHI H., KITAGAWA M., NAKAYAMA K., SAITO Y. & HIRAI A. (1998), Activation of cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) in growth-stimulated rat astrocytes. The Journal of biological chemistry, Vol. 273, 41, S. 26772-26778.
- THORNTON, F. J., SCHAFFER, M. R., WITTE, M. B., MOLDAWER, L. L., MACKAY, S. L., ABOUHAMZE, A., TANNAHILL, C. L. & BARBUL, A. (1998), Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wounds. Biochemical and biophysical research communications, Vol. 246, S. 654-659.
- TIRILLY, Y., KLOOSTERMAN, J., SIPMA, G. & KEITENES-VAN DEN BOSCH, J. J. (1983), A fungitoxic sesquiterpene from *Hansfordia pulvinata*. Phytochem, Vol. 22, S. 2082-2083.
- TUKUNAGA, K., NAKAMURA, Y., SAKATA, K., FUJIMORI, K., OHKUBO, M., SAWADA, K. & SAKIYAMA, S. (1987), Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. Cancer research, Vol. 47, S. 5616-5619.
- TRACEY, W. R., POLLOCK, J. S., MURAD, F., NAKANE, M. & FÖRSTERMANN, U. (1994), Identification of a type III (endothelial-like) particulate nitric oxide synthase in LLC-PK1 kidney tubular epithelial cells. American journal of physiology, Vol. 266, S. C22-C26.

- UEMATSU, M., OHARA, Y., NAVAS, J. P., NISHIDA, K., MURPHY, T. J.,  
ALEXANDER, R. W., NEREM, R. M. & HARRISON, D. G. (1995), Regulation of  
endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. American journal of  
physiology, Vol. 269, S. C1371-1378.
- VERBURG, K. M., MAZIASZ, T. J., WEINER, E., LOOSE, L., GEIS, G. S. &  
ISAKSON, P.C. (2001), Cox-2-specific inhibitors: definition of a new therapeutic concept.  
Am J Ther., Vol. 8, S. 49-64.
- VESONDER, R. F., CIEGLER, A., FENNELL, D. & TJARKS, L. W. (1976), Curvularin  
from *penicillium baradicum* Baghdadi NRRL 3754, and biological effects. J Environ  
Sci Health B, Vol. 11, 44, S. 289-271.
- VODOVOTZ, Y., BOGDAN, C., PAIK, J., XIE, Q.-W. & NATHANE, C. (1993),  
Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth  
factor- $\beta$ . The Journal of experimental medicine, Vol. 178, S. 605-613.
- VOJTEK, A. B. & DER, C. J. (1998), Increasing complexity of the ras signaling pathway.  
The Journal of biological chemistry, Vol. 273, S. 19925-19928.
- WALLERATH, T., GATH, I., AULITZKY, W. E., POLLOCK, J. S., KLEINTER, H. &  
FÖRSTERMANN, U. (1997), Identification of the NO synthase isoforms expressed in human  
neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. Thrombosis and haemostasis, Vol.  
77, S. 163-167
- WANG, R., GHARRY, A., SHEN, Y. J., SCOTT, P. G. & TREDGET, E. E. (1996), Human  
dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric  
oxide synthase isoforms. The Journal of investigative dermatology, Vol. 106,  
S. 419-427.
- WANG, Y., GOLIGORSKY, M. S., LIN, M., WILCOX, J. N. & MARSDEN, P. A. (1997),  
A novel, testis-specific mRNA transcript encoding an NH<sub>2</sub>-terminal truncated nitric-oxide  
synthase. The Journal of biological chemistry, Vol. 272, S. 11392-11401.
- WEINER, C. P., LIZASOAIN, I., BAYLIS, S. A., KNOWLES, R. G., CHARLES, I. G. &  
MONCADA, S. (1994), Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex  
hormones. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of  
America, Vol. 91, S. 5212-5216.
- WEISZ, A. , OGUCHI, S., CICATIELLO & ESUMI, H. (1994), Dual Mechanism for the  
control of inducible-type NO synthase gene expression in macrophages during activation by  
interferon- $\gamma$  and bacterial lipopolysaccharide - transcriptional and post-transcriptional  
regulation. The Journal of biological chemistry, Vol. 269,  
S. 8324-8333.
- WHITE, K. A. & MARLETTA, M. A. (1992), Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450  
type hemoprotein. Biochemistry, Vol. 31, S. 66627-6631.
- WITTECK, A. (2000), Regulation der humanen iNOS über die kleinen G-Proteine der Rho-Familie.  
Dissertation, Universität Mainz.
- WITTER, L., ANKE, T. & STERNER, O. (1998), A new inhibitor of synovial phospholipase  
A<sub>2</sub> from fermentations of *Penicillium* sp. 62-92. Z Naturforsch [C], Vol. 53, S. 60-64.

- WOOD, E. R., BERGER, H. J., SHERMANN, P. A. & LAPETINA, E. G. (1993), Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene. *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 191, S. 767-774.
- WRIGHT, K., WARD, S. G., KOLIOS, G. & WESTWICK, J. (1997), Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by interleukin-13. An inhibitory signal for inducible nitric-oxide synthase expression in epithelial cell line HT-29. *The Journal of biological chemistry*, Vol. 272, S. 12626-12633.
- XIE, J., RODDY, P., RIFE, T. K., MURAD, F. & YOUNG, A. P. (1995), Two closely linked but separable promoters for human neuronal nitric oxide synthase gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 92, S. 1242-1246.
- XIE, Q. W., CHO, H. J., CALAYAY, J., MUMFORD, R. A., SWIDEREK, K. M., LEE, T. D., DING, A., TROSO, T. & NATHAN, C. (1992), Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science*, Vol. 256, S. 225-228.
- XIE, Q. W., WHISNANT, R. & NATHAN, C. (1993), Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon  $\gamma$  and bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine*, Vol. 177, S. 1779-1784.
- XU, G.F., LIN, B., TANAKA, K., DUNN, D., WOOD, D., GESTELAND, R., WHITHE, R., WEISS, R. & TAMANOI, F. (1990), The catalytic domain of the neurofibromatosis type 1 gene product stimulates ras GTPase and complements ira mutants of *S. cerevisiae*. *Cell*, Vol. 63, S. 835-841.
- YAMAMOTO, K., ARAKAWA, T., UEDA, N. & YAMAMOTO, S. (1995), Transcriptional Roles of Nuclear Factor kappaB and Nuclear Factor-Interleukin-6 in the Tumor Necrosis Factor alpha-Dependent Induction of Cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 Cells. *J. Biol. Chem.*, Vol. 270, S. 31315-31320.
- YAMASAKI, K., EDINGTON, H. D., MCGLOSKY, C., TZENG, E., LIZONOVA, A., KOVESDI, I., STEED, D. L. & BILLIAR, T. R. (1998), Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *The Journal of clinical investigation*, Vol. 101, S. 967-971.
- ZÄHNER, H. & ANKE, H. (1983), In *Secondary metabolites and differentiation in fungi*. J.W. Bennett und A. Ciegler, Herausgeber: M. Dekker, NY, S. 153-171.
- ZAPF, S., HOSSFELD, M., ANKE, H., VELTEN, R. & STREGLICH W. (1995), Darlucins A and B, new isocyanide antibiotics from *Sphaerellopsis filum* (*Darluca filum*). *JAntibiot*, Vol. 48, S. 36-41.
- ZHANG, H., CHEN, X., TENG, X., SNEAD, C. & CATRAVAS, J. D. (1998), Molecular cloning and analysis of the rat inducible nitric oxide synthase gene promoter in aortic smooth muscle cells. *Biochemical pharmacology*, Vol. 55, S. 1873-1880.

ZIESCHE, R., PETKOV, V., WILLIAMS, J., ZAKERI, S. M., MOSGOLLER, W., KNOFLER, M. & BLOCK, L. H. (1996) Lipopolysaccharide and interleukin 1 augment the effects of hypoxia and inflammation in human pulmonary arterial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 93, S. 12478-12483.

ZIMMERMANN, H., KURZEN, P., KLOSSNER, W., RENNER, E. L. & MARTIN, U. (1996), Decreased constitutive hepatic nitric oxide synthase expression in secondary biliary fibrosis and its changes after Roux-en-Y choledocho-jejunostomy in the rat. *Journal of hepatology*, Vol. 25, S. 567-573.

ZINI, A., O' BRYAN, M. K., MAGID, M. S. & SCHLEGEL, P. N. (1996), Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biology of reproduction*, Vol. 55, S. 935-941.

**Lebenslauf**

**Name:** Michael Hausding

**Geburtsdatum:** 11.09.1966

**Geburtsort:** Darmstadt

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Familienstand:** ledig

**Schulausbildung:**

1973 - 1977 Grundschohle Hahn in Pfungstadt

1977 - 1986 Gymnasium Gernsheim / Rhein

03.06.1986 Abitur

**Studium:**

1989-1997 Studium der Biologie an der Universität Göttingen

10.07.1991 Vordiplom Biologie

März 1996- Mai 1997 Anfertigung der Diplomarbeit am Hygiene-Institut der Universität Göttingen; Thema der Diplomarbeit: „Einfluss zytostatisch aktiver Ganglioside auf die Genexpression von Zellen des Burkitt-Lymphoms“

03.06.1997 Diplom Biologie (Hauptfach Biochemie)

März 1998 – April 2001 Anfertigung der vorliegenden Dissertation im Lehrbereich Biotechnologie der Universität Kaiserslautern und im Lehrbereich Pharmakologie der Universität Mainz

August 2001 - jetzt Mitarbeit an der I. Medizinischen Klinik der Universität Mainz, Arbeitsgruppe von PD Dr. Susetta Finotto

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt:

- PD Dr. Hartmut Kleinert und PD Dr. Gerhard Erkel für die ausführliche Einarbeitung, sehr gute Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft.
- Prof. Dr. Timm Anke und Prof. Dr. Ulrich Förstermann für die Bereitstellung des Themas und die ständige Diskussionsbereitschaft.
- Kerstin Masch für die Unterstützung bei den Griess-Analysen, Irmgard Ihrig-Biedert für ihre geduldigen Ratschläge betreffend der Klonierungen für Transfektionen und Andrea Witteck für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit, nicht zuletzt wegen der anregenden Unterhaltung und auch der Vermittlung medizinischer Fachkenntnisse.
- Meike Saul für die große Unterstützung bei den Fermenter-Analysen, der Anlage der Pilzkulturen und den Reporter-Assays, außerdem danke ich Wolfgang Schuck für die Hilfe in der Fermentation.
- Meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, für Geduld, Interesse und ihr Verständnis für die manchmal etwas ungewöhnlichen Arbeitszeiten.
- Allen, die mir während meiner Doktorarbeit stets mit Hilfestellungen und Ratschlägen zur Seite standen: Hartmut, Irmgard, Kerstin, Andrea, Ursula, Christof, Jutta, Fernando, Thomas, Christian, Jean-Paul, Sabine, Nicole, Ellen, Jan, Kerstin, Michael, Andreas, Heike, Abdel, Marek, Andreas, Ute, Huige, Peter, Christian, Susanne, Göran, Daniela, Iris, Annette, Marco, Uschi, Alice und alle anderen, die ich nicht namentlich erwähnt habe. Ohne Euch hätte es nicht annähernd soviel Spaß gemacht!
- Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts für die stets große Hilfsbereitschaft, auch in Sachen Computer.
- Danken möchte ich insbesondere Alessandro, Annette, Andrea, Dietmar und allen anderen Freunden für ihre stets große Geduld in den etwas schwierigeren Phasen der Doktorarbeit.

### **Publikationen**

1. Rodriguez-Pasqual, F., Hausding M., Ihrig-Biedert I., Furneaux H., Levy A.P., Förstermann U. & Kleinert H. (2000), Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR. J Biol Chem., Vol. 275, 34, S. 26040-26049.
2. Schaade L., Kleines M., Krone B., Hausding M., Walter R. & Ritter K. (2000), Enhanced transcription of the s-adenosylhomocysteine hydrolase gene precedes Epstein-Barr virus lytic gene activation in ganglioside-stimulated lymphoma cells. Med Microbiol Immunol (Berl), Vol. 189, 1, S. 13-18.
3. Hausding M., Witteck A., Rodriguez-Pasqual F., von Eichel-Streiber C., Förstermann U. & Kleinert H. (2000), Inhibition of small G proteins of the rho family by statins or clostridium difficile toxin B enhances cytokine-mediated induction of NO synthase II. Br J Pharmacol., Vol. 131, 3, Vol. 553-561.